



(10) 授权公告号 CN 114502566 B

(45) 授权公告日 2025.02.11

(21) 申请号 202080070607.0

(22) 申请日 2020.08.25

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114502566 A

(43) 申请公布日 2022.05.13

(30) 优先权数据
2019-187930 2019.10.11 JP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.07

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/JP2020/032020 2020.08.25

(87) PCT国际申请的公布数据
W02021/070494 JA 2021.04.15

(73) 专利权人 住友化学株式会社
地址 日本东京都

(72) 发明人 宫川卓也 奥村英贵

(74) 专利代理机构 北京市金杜律师事务所
11256
专利代理师 杨宏军 周莎

(51) Int.Cl.
C12N 15/00 (2006.01)
C07H 21/02 (2006.01)
C07H 21/04 (2006.01)
C07H 1/00 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 112020507 A, 2020.12.01
CN 116209668 A, 2023.06.02
TW 202146012 A, 2021.12.16
US 2024051986 A1, 2024.02.15

审查员 焦姣姣

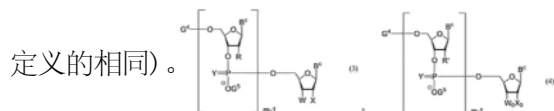
权利要求书5页 说明书33页
序列表5页

(54) 发明名称

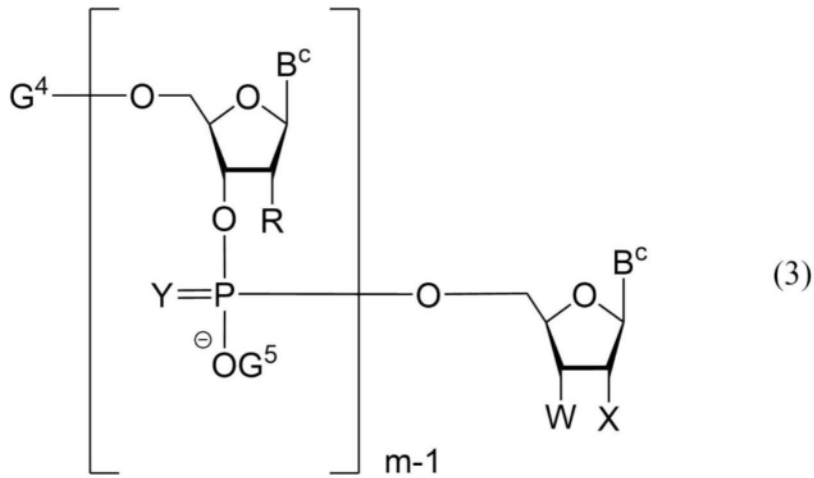
核酸寡聚物的制造方法

(57) 摘要

本发明提供核酸寡聚物的高效的制备方法、特别是高效地对核酸寡聚物中的核糖的羟基的保护基进行去保护的方法。具体而言,本发明还提供式(4)所示的核酸寡聚物的制造方法,其包括在氧浓度为15%以下的非活性气体气氛下使式(3)所示的核酸寡聚物与氟化物离子接触反应(式(3)及式(4)中的各基团的定义与说明书中所



1. 式 (4) 所示的核酸寡聚物的制造方法, 其特征在于, 在氧浓度为 10% 以下的非活性气体气氛下, 使式 (3) 所示的核酸寡聚物与氟化物离子接触,

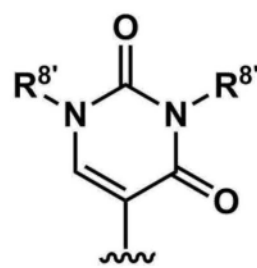
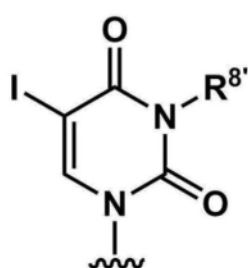
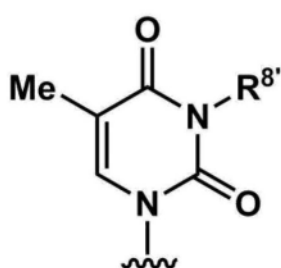
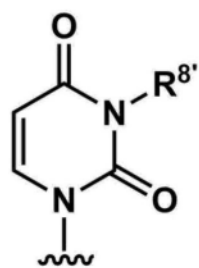
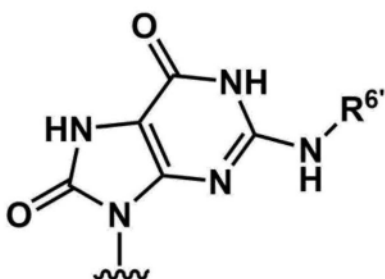
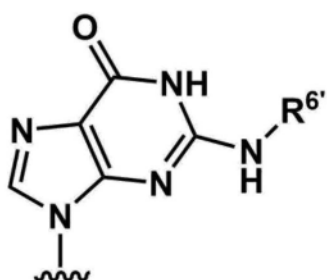
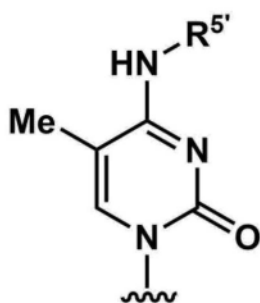
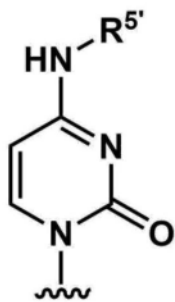
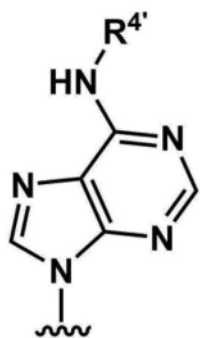


式 (3) 中,

G^4 表示氢原子或羟基的保护基,

G^5 表示铵离子、烷基铵离子、碱金属离子、氢离子或羟基烷基铵离子,

B^c 相同或彼此不同, 各自独立地表示以下的结构,



上述式中,

R^4 表示氢原子或甲基,

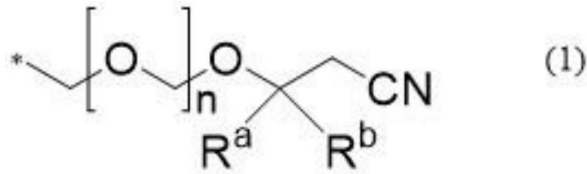
R^5 表示氢原子或乙酰基,

R^6 表示氢原子,

R^8 表示氢原子或甲基,

R 相同或彼此不同,各自独立地表示氢原子、氟原子或 OQ 基, Q 相同或彼此不同,各自独立地表示叔丁基二甲基甲硅烷基、甲基、2-甲氧基乙基、与核糖的 4' 位的碳原子键合的亚甲基、与核糖的 4' 位的碳原子键合的亚乙基、与核糖的 4' 位的碳原子键合的乙叉基、或式 (1)

的保护基,



式(1)中,

R^a 及 R^b 相同或彼此不同,表示甲基、乙基或氢原子,

带*标记的键表示是与OQ基的氧原子之间的键,

n 表示1,

其中, R^a 及 R^b 不同时表示氢原子,

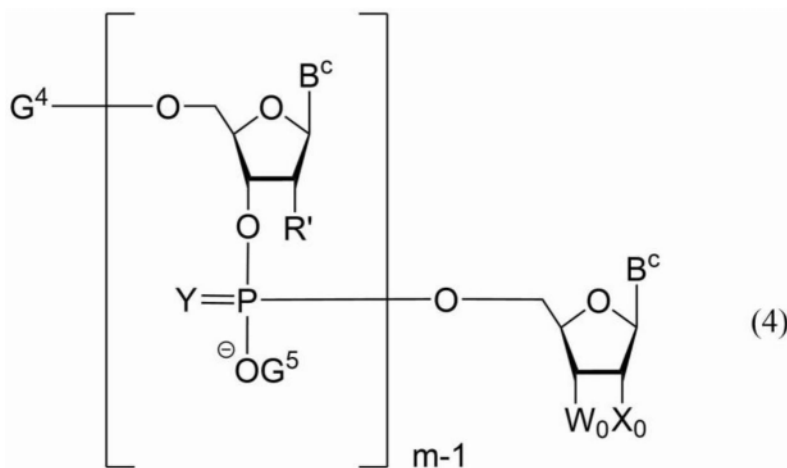
Y 相同或彼此不同,各自独立地表示氧原子或硫原子,

m 表示2以上200以下的任一整数,

W 为羟基, X 为R基,

所述R及X中的至少一个基团表示已被所述式(1)的保护基保护的羟基,并且

m 为3以上的整数时,式(3)所示的核酸寡聚物为可代替各个5'末端和3'末端的核苷酸之间的 p 个核苷酸而组入了非核苷酸接头的核酸寡聚物,其中, p 为满足式: $m-1 > p$ 的正整数;



式(4)中,

R' 相同或彼此不同,各自独立地表示羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基、或OQ'基,

Q' 相同或彼此不同,各自独立地表示与核糖的4'位的碳原子键合的亚甲基、与4'位的碳原子键合的亚乙基、或与4'位的碳原子键合的乙叉基,

式(4)的取代基 G^4 、 G^5 、 Y 、 B^c 及 m 的定义与所述式(3)中的定义相同,

W_0 为羟基,

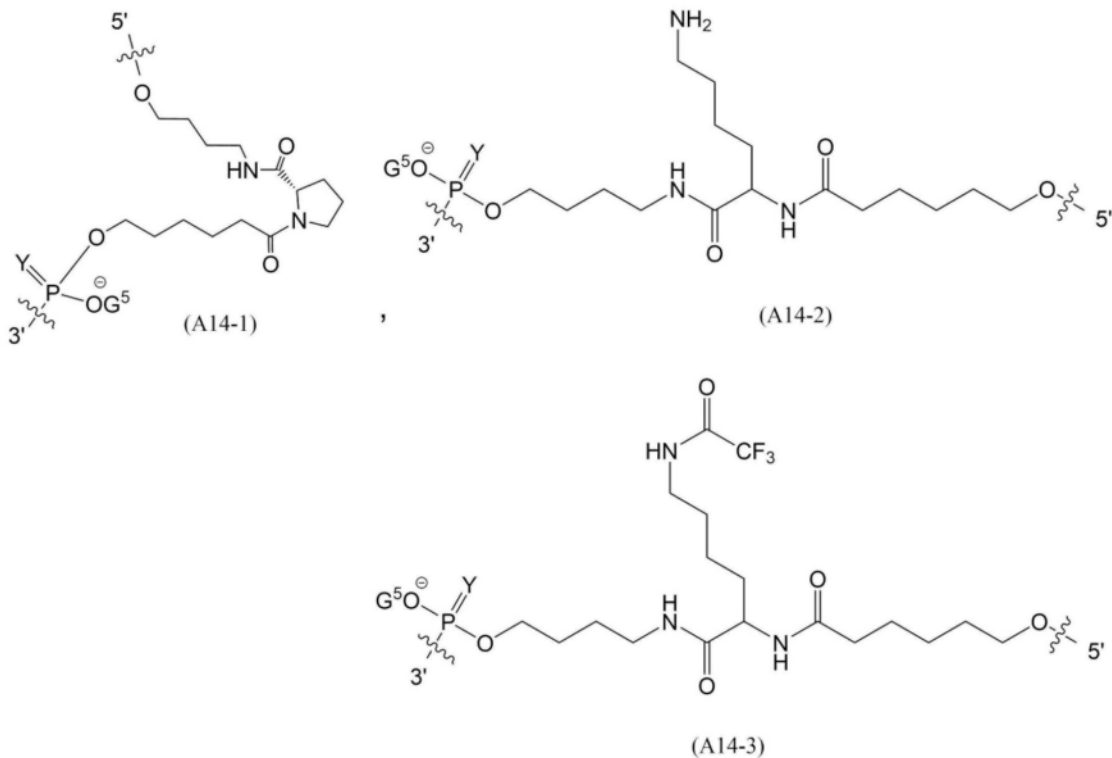
X_0 与所述 R' 基的定义相同,

并且, m 为3以上的整数时,式(4)所示的核酸寡聚物为可代替各个5'末端和3'末端的核苷酸之间的 p 个核苷酸而组入了非核苷酸接头的核酸寡聚物,其中, p 为满足式: $m-1 > p$ 的正整数,

其中,使式(3)所示的核酸寡聚物与氟化物离子接触的反应的反应温度为 $10^\circ\text{C} \sim 45^\circ\text{C}$,

该非活性气体为氮气、氩气、氦气或二氧化碳中的至少一种，

该非核苷酸接头为具有下述式 (A14-1)、(A14-2) 或式 (A14-3) 的结构接头，



式 (A14-1)、(A14-2)、(A14-3) 中, 5' 及 3' 分别表示核酸寡聚物的 5' 末端侧及 3' 末端侧, 该氟化物离子的氟化物离子源为四烷基氟化铵, 该四烷基氟化铵为四正丁基氟化铵即 TBAF。

2. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 在氧浓度为 5% 以下的非活性气体气氛下进行反应。

3. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 在氧浓度为 0% 的非活性气体气氛下进行反应。

4. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 向式 (3) 所示的核酸寡聚物中添加全部量的氟化物离子所需的时间为 30 分钟以上。

5. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 式 (3) 所示的核酸寡聚物的 R 及 X 之中, 所述式 (1) 的保护基的比例为 5% 以上。

6. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 式 (3) 所示的核酸寡聚物的 R 及 X 之中, 所述式 (1) 的保护基的比例为 10% 以上。

7. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 式 (3) 所示的核酸寡聚物的 R 及 X 之中, 所述式 (1) 的保护基的比例为 20% 以上。

8. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 式 (3) 所示的核酸寡聚物的 R 及 X 之中, 所述式 (1) 的保护基的比例为 30% 以上。

9. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 式 (3) 所示的核酸寡聚物的 R 及 X 之中, 所述式 (1) 的保护基的比例为 40% 以上。

10. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 式 (3) 所示的核酸寡聚物的 R 及 X 之中, 所述式 (1) 的保护基的比例为 50% 以上。

11. 如权利要求 1 所述的制造方法, 其中, 式 (3) 所示的核酸寡聚物的 R 及 X 之中, 所述式

(1)的保护基的比例为60%以上。

12.如权利要求1所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R及X之中,所述式(1)的保护基的比例为70%以上。

13.如权利要求1所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R及X之中,所述式(1)的保护基的比例为80%以上。

14.如权利要求1所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R及X之中,所述式(1)的保护基的比例为90%以上。

15.如权利要求1所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R及X之中,所述式(1)的保护基的比例为95%以上。

16.如权利要求1所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R及X之中,所述式(1)的保护基的比例为100%。

核酸寡聚物的制造方法

技术领域

[0001] 本专利申请基于日本专利申请2019-187930号(于2019年10月11日提出申请)主张巴黎公约规定的优先权及利益,上述申请中记载的全部内容通过引用并入本说明书中。

[0002] 本发明涉及包含核糖的核酸寡聚物的制造方法,更详细而言,涉及核酸寡聚物中所含的核糖的羟基的保护基的去保护方法。

背景技术

[0003] 作为包含核糖的核酸寡聚物的RNA可用作RNA探针、反义RNA、核酶、siRNA、适配体等,是有用的材料。

[0004] 核酸寡聚物能利用固相合成法而合成,固相合成法中将核苷的亚磷酰胺(以下,称作“酰胺(amidite)”)用作原料。将在固相载体上使核酸延伸而合成的核酸寡聚物从固相载体切出,接着,对于包含核糖的核酸寡聚物,对核糖的2'位的羟基的保护基进行去保护而去除,制备作为目标的核酸寡聚物。由于经过核酸在固相载体上的延伸反应工序、从固相载体切出的工序、各保护基的去保护工序等多阶段的工序,因此以此方式合成的核酸寡聚物的纯度并不总令人满意,合成也并非高效的(专利文献1、2)。

[0005] 现有技术文献

[0006] 专利文献

[0007] 专利文献1:国际公开第2006/022323号公报

[0008] 专利文献2:国际公开第2013/027843号公报

发明内容

[0009] 发明所要解决的课题

[0010] 本发明的目的在于提供核酸寡聚物的高效的制备方法。

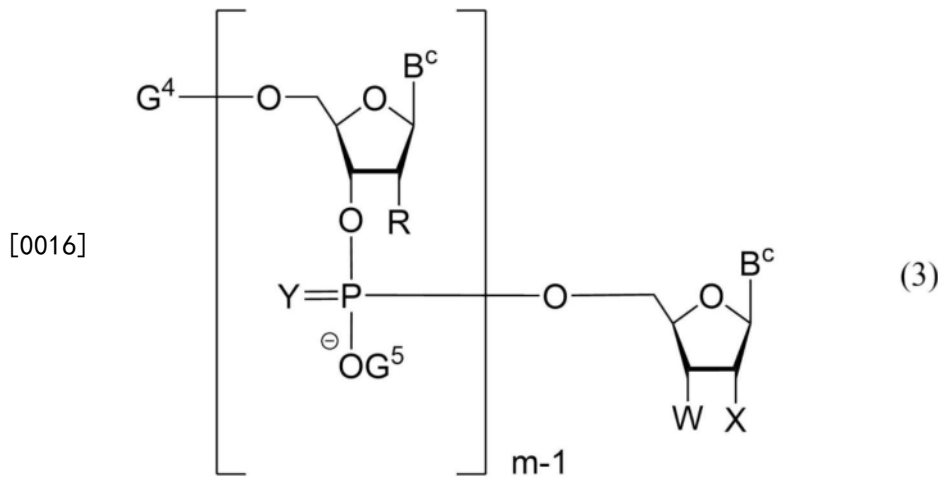
[0011] 用于解决课题的手段

[0012] 本申请发明人为了达成上述目的而反复进行了认真研究,结果得到了下述见解:在氧浓度为一定以下的非活性气体气氛下,使氟化物离子与核酸寡聚物接触,从而可高效地对该核酸寡聚物中所含的核糖的羟基的保护基进行去保护,作为结果,可提供核酸寡聚物的高效的制备方法。

[0013] 基于上述见解而完成了本发明,本发明包含以下方式,但并不限于此。

[0014] 项1.式(4)所示的核酸寡聚物的制造方法(以下,本说明书中称作“本发明的制造方法”),其特征在于,在氧浓度为15%以下的非活性气体气氛下,使式(3)所示的核酸寡聚物与氟化物离子接触,

[0015] [化学式1]



[0017] (式(3)中,

[0018] G^4 表示氢原子或羟基的保护基,

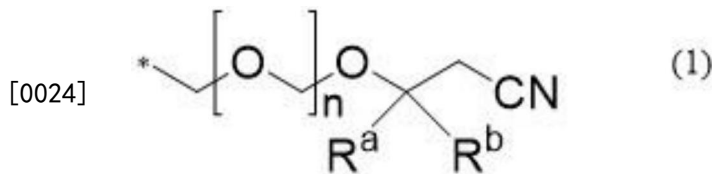
[0019] G^5 表示铵离子、烷基铵离子、碱金属离子、氢离子或羟基烷基铵离子,

[0020] B^c 各自独立地表示相同或彼此不同的核酸碱基,

[0021] R相同或彼此不同,各自独立地表示氢原子、氟原子或OQ基,

[0022] Q相同或彼此不同,各自独立地表示叔丁基二甲基甲硅烷基、甲基、2-甲氧基乙基、与核糖的4'位的碳原子键合的亚甲基、与核糖的4'位的碳原子键合的亚乙基、与核糖的4'位的碳原子键合的乙叉基、或式(1)的保护基,

[0023] [化学式2]



[0025] (式(1)中,

[0026] R^a 及 R^b 相同或彼此不同,表示甲基、乙基或氢原子,

[0027] 带*标记的键表示是与OQ基的氧原子之间的键,

[0028] n表示1~5中的任一整数。

[0029] 其中, R^a 及 R^b 不同时表示氢原子)

[0030] Y相同或彼此不同,各自独立地表示氧原子或硫原子,

[0031] m表示2以上200以下的任一整数,

[0032] W及X由下述(a)或(b)中的任一者定义,

[0033] (a)W为羟基时,X与所述R基的定义相同。

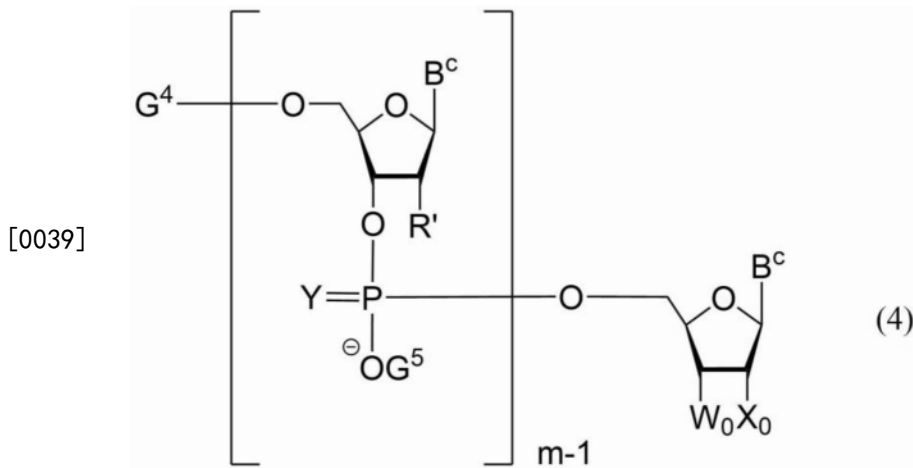
[0034] (b)X为羟基时,W表示OV基,

[0035] V表示叔丁基二甲基甲硅烷基、或前述式(1)的基团。

[0036] 其中,前述R、W及X中的至少一个基团表示已被前述式(1)的保护基保护的羟基。并且

[0037] m为3以上的整数时,式(3)所示的核酸寡聚物为可代替在各个5'末端和3'末端的核苷酸之间的p个(其中,p为满足式: $m-1 > p$ 的正整数。)核苷酸而组入了非核苷酸接头的核酸寡聚物。)

[0038] [化学式1]



[0040] (式(4)中,

[0041] R' 相同或彼此不同,各自独立地表示羟基、氢原子、氟原子、甲氧基、2-甲氧基乙基、或OQ'基,

[0042] Q' 相同或彼此不同,各自独立地表示与核糖的4'位的碳原子键合的亚甲基、与4'位的碳原子键合的亚乙基、或与4'位的碳原子键合的乙叉基,

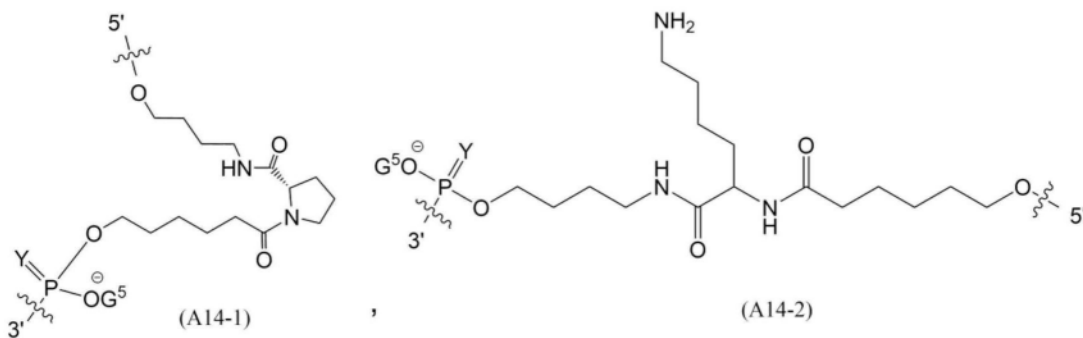
[0043] 式(4)的取代基G⁴、G⁵、Y、B^c及m的定义与前述式(3)中的定义相同,[0044] W₀为羟基,[0045] X₀与前述R'基的定义相同。

[0046] 并且,m为3以上的整数时,式(4)所示的核酸寡聚物为可代替各个5'末端和3'末端的核苷酸之间的p个(其中,p为满足式:m-1>p的正整数。)核苷酸而组入了非核苷酸接头的核酸寡聚物。)

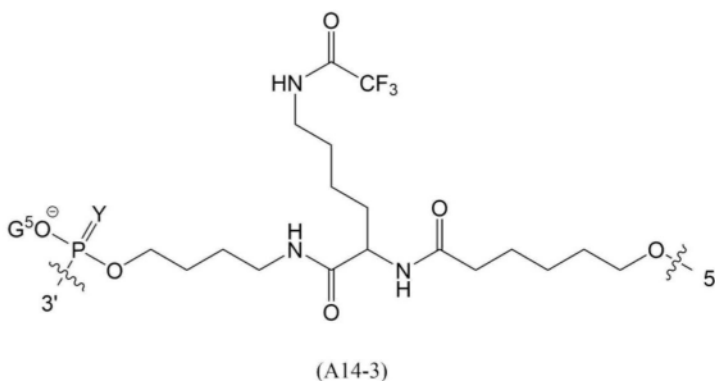
[0047] 项2.如前述项1所述的制造方法,其中,非核苷酸接头为包含氨基酸骨架的接头。

[0048] 项3.如前述项2所述的制造方法,其中,包含氨基酸骨架的接头为具有下述式(A14-1)、(A14-2)或式(A14-3)的结构接头。

[0049] [化学式4]



[0050]



[0051] (式(A14-1)、(A14-2)、(A14-3)中,5'及3'分别表示核酸寡聚物的5'末端侧及3'末端侧)

[0052] 项4.如前述项1~3中任一项所述的制造方法,其中,W为羟基,X为R基,W₀为羟基,并且X₀为R'基。

[0053] 项5.如前述项1~4中任一项所述的制造方法,其中,氟化物离子源为四烷基氟化铵。

[0054] 项6.如前述项1~5中任一项所述的制造方法,其中,四烷基氟化铵为四正丁基氟化铵(TBAF)。

[0055] 项7.如前述项1~6中任一项所述的制造方法,其中,在氧浓度为10%以下的非活性气体气氛下进行反应。

[0056] 项8.如前述项1~6中任一项所述的制造方法,其中,在氧浓度为5%以下的非活性气体气氛下进行反应。

[0057] 项9.如前述项1~6中任一项所述的制造方法,其中,在氧浓度为0%的非活性气体气氛下进行反应。

[0058] 项10.如前述项1~9中任一项所述的制造方法,其中,向式(3)所示的核酸寡聚物中添加全部量的氟化物离子所需的时间为30分钟以上。

[0059] 项11.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为5%以上。

[0060] 项12.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为10%以上。

[0061] 项13.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为20%以上。

[0062] 项14.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的

R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为30%以上。

[0063] 项15.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为40%以上。

[0064] 项16.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为50%以上。

[0065] 项17.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为60%以上。

[0066] 项18.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为70%以上。

[0067] 项19.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为80%以上。

[0068] 项20.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为90%以上。

[0069] 项21.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为95%以上。

[0070] 项22.如前述项1~10中任一项所述的制造方法,其中,式(3)所示的核酸寡聚物的R、W及X之中,前述式(1)的保护基的比例为100%。

[0071] 发明效果

[0072] 本发明提供高效的核酸寡聚物的制备方法。可期待所制备的核酸寡聚物的纯度得以提高。

具体实施方式

[0073] 对在氧浓度为15%以下的非活性气体气氛下使下述式(3)所示的核酸寡聚物与氟化物离子接触、以制备式(1)的保护基被去保护的式(4)所示的核酸寡聚物的方法进行说明。

[0074] 式(1)中, R^a 及 R^b 均可以为甲基、乙基或氢原子,优选 R^a 为甲基或乙基、 R^b 为氢,更优选 R^a 为甲基、 R^b 为氢。 n 优选为1~4的整数,更优选为1~3的整数,进一步优选为1或2,特别优选为1。

[0075] 式(3)的R、W及X之中的至少一方的基团表示用已被前述式(1)的保护基保护的羟基。R、W及X之中,式(1)的比例可以为1%以上,更优选为5%以上,更优选为10%以上,更优选为20%以上,更优选为30%以上,更优选为40%以上,更优选为50%以上,更优选为60%以上,更优选为70%以上,更优选为80%以上,更优选为90%以上,进一步更优选为95%以上。

[0076] 式(3)所示的核酸寡聚物与氟化物离子的接触反应中,也可将氟化物离子添加至式(3)所示的核酸寡聚物,反之,也可向氟化物离子中添加式(3)所示的核酸寡聚物,还可同时加入这两者。优选将氟化物离子添加至式(3)所示的核酸寡聚物的方法。对于向式(3)所示的核酸寡聚物中添加全部量的氟化物离子所需的时间而言,优选经5分钟以上、更优选经10分钟以上、更优选经15分钟以上、更优选经30分钟以上、进一步优选经1小时以上进行滴加。

[0077] 对于该添加而言,优选经5分钟以上、更优选经10分钟以上、更优选经15分钟以上、更优选经30分钟以上、进一步优选经1小时上而滴加至含有式(3)所示的核酸寡聚物的溶液的液体表面或液体中。

[0078] 在对该式(1)所示的羟基的保护基进行去保护的工序中,作为氟化物离子源,典型地使用四烷基氟化铵。

[0079] 作为四烷基氟化铵,可举出四丁基氟化铵、及四甲基氟化铵等。其中,更优选四丁基氟化铵(TBAF)。

[0080] 所使用的氟化物离子的量相对于被去除的保护基1摩尔而言通常为1~1000摩尔,优选为1~500摩尔,更优选为2~200摩尔,进一步优选为4~100摩尔。

[0081] 该工序中,通常使用对反应呈惰性的有机溶剂,具体而言,例如可举出亚砷溶剂、腈溶剂、醚溶剂、酰胺溶剂、酮溶剂、脂肪族烃溶剂、酯溶剂、芳香族溶剂、或上述中的两种以上的混合溶剂,这些溶剂之中,优选亚砷溶剂。作为亚砷溶剂,可举出二甲基亚砷等。作为腈溶剂,可举出乙腈、及丙腈等。作为醚溶剂,可举出四氢呋喃等。作为酰胺溶剂,可举出N-甲基-2-吡咯烷酮等。作为酮溶剂,可举出丙酮、及甲基乙基酮等。作为脂肪族烃溶剂,可举出己烷、及庚烷等。作为酯溶剂,可举出乙酸甲酯、及乙酸乙酯等。作为芳香族溶剂,可举出甲苯、及吡啶等。其中,优选二甲基亚砷、或二甲基亚砷与乙腈的混合溶剂。

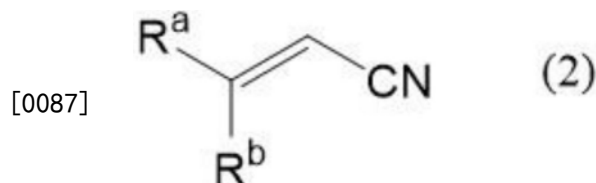
[0082] 就作为用于脱去式(1)所示的羟基的保护基的工序中的试剂的氟化物离子源而言,溶解于溶剂中后,通常进行脱水而使用。作为脱水剂,可举出分子筛、硫酸盐等,优选使用分子筛4A。

[0083] 相对于供于去保护工序的核酸寡聚物1摩尔而言,所使用的溶剂的量通常为5~8,000L,优选为50~2,000L,更优选为100~1,600L。

[0084] 根据需要,可添加与作为本工序中的副产物的下述式(2)中示出的腈化合物进行反应而捕捉该腈化合物的化合物。作为该进行捕捉的化合物,例如可举出硝基烷、烷基胺、脒、硫醇、硫醇衍生物或上述中的两种以上的混合物。作为“硝基烷”,例如可举出硝基甲烷。作为“烷基胺”,例如可举出直链状的碳原子数为1~6的烷基胺、及碳原子数为1~8的环状胺。具体而言,例如可举出甲胺、乙胺、正丙胺、正丁胺、正戊胺、正己胺、吗啉、及哌啶。作为“脒”,例如可举出苯甲脒、及甲脒。作为“硫醇”,例如可举出直链状的碳原子数为1~6的硫醇。具体而言,例如可举出甲硫醇、乙硫醇、1-丙硫醇、1-丁硫醇、1-戊硫醇、及1-己硫醇。作为“硫醇衍生物”,例如可举出具有同一或不同的直链状的碳原子数为1~6的烷基硫醇基的醇或醚。具体而言,例如可举出2-巯基乙醇、4-巯基-1-丁醇、6-巯基-1-己醇、巯基甲醚、2-巯基乙醚、3-巯基丙醚、4-巯基丁醚、5-巯基戊醚、及6-巯基己醚。作为该进行捕捉的化合物,更优选使用硝基甲烷。

[0085] 式(2)所示的化合物:

[0086] [化学式5]



[0088] (式(2)中, R^a 及 R^b 相同或彼此不同,表示甲基、乙基或氢原子。其中, R^a 及 R^b 不同时

表示氢原子。)

[0089] 就对作为副产物的式(2)中示出的化合物进行捕捉的化合物的使用量而言,相对于使式(1)所示的羟基的保护基脱离的氟化物离子源,可以使用0.1~100.0摩尔%、优选1.0~50.0摩尔%、优选2.0~40.0摩尔%、更优选3.0~30.0摩尔%。

[0090] 对式(1)所示的羟基的保护基进行去保护的反应的温度因所使用的去保护剂的种类而异,但通常为0℃~80℃,优选为10℃~45℃,更优选为15℃~35℃。

[0091] 此外,去保护反应的时间因所使用的去保护剂的种类、反应的温度而异,通常为1小时~100小时,优选为1~24小时,更优选为2~12小时,更优选为3~10小时,更优选为3~8小时,进一步优选为3~6小时。

[0092] 需要说明的是,可以在任意的时机变更反应的温度,另外,也可在任意的时机追加对式(1)所示的羟基的保护基进行去保护的剂。

[0093] 对于氧浓度为15%以下的非活性气体气氛而言,例如,制备前述规定的氧浓度以下的非活性气体,供于反应体系,可通过测定并确认气相中的氧浓度为前述设定浓度范围内而进行调整。具体而言,可通过下述方式来进行调整:使氩气或氮气等高纯度的非活性气体、或已将氧浓度调整至规定浓度的非活性气体在反应体系的气相中流通;或者,用前述非活性气体或经过浓度调整的非活性气体置换反应体系的气相气氛。

[0094] 此处,本发明的制法中所使用的非活性气体可举出氮气、氩气、氦气、二氧化碳,但并不限于此。优选举出氮气或氩气。

[0095] 反应体系气氛置换方法可以为减压置换、加压置换、流通置换(flow replacement)、基于鼓泡的置换、或基于冷冻脱气的置换,此时可以施加超声波,也可以进行加热。更优选的方法为流通置换及减压置换。

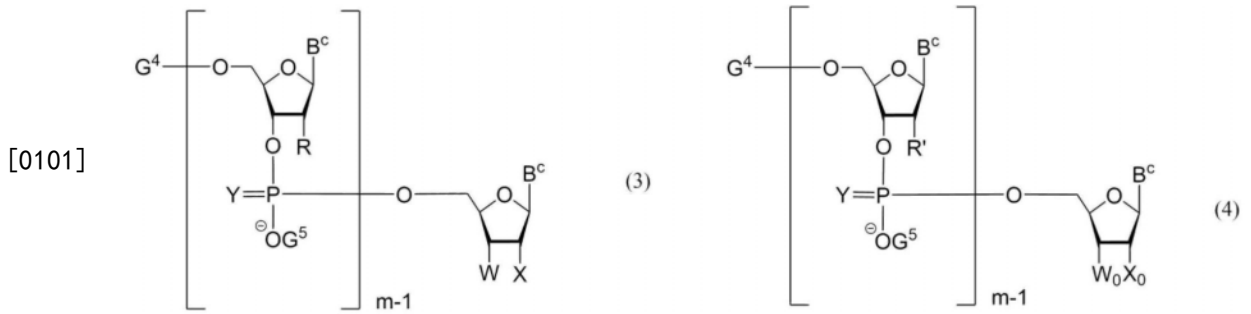
[0096] 氧浓度优选为15%以下,更优选为10%以下,更优选为5%以下,进一步更优选为0%。

[0097] 在保护基的脱离反应时,虽然反应体系的搅拌并不是必须的,但通常在搅拌功率 P_v 为0.0~0.5kW/m³的范围内进行搅拌,优选 P_v 为0.1~0.3kW/m³的搅拌。

[0098] 从反应后生成的核酸寡聚物的反应混合物中的分离纯化手段可采用通常的方法,可通过使用例如萃取、浓缩、中和、过滤、离心分离、重结晶、硅胶柱层析、薄层色谱法、反相柱层析、离子交换柱层析、凝胶过滤柱层析、疏水相互作用层析、亲水相互作用层析、沉淀(例如使用了乙醇、异丙醇、甲醇或聚乙二醇的核酸寡聚物的沉淀)、透析、超滤等手段,将作为2'位或3'位的羟基的保护基的式(1)带来的保护进行去保护。可将经纯化的核酸寡聚物分离。分离的核酸寡聚物通常以其5'末端的羟基已被保护的核酸寡聚物的形式得到。

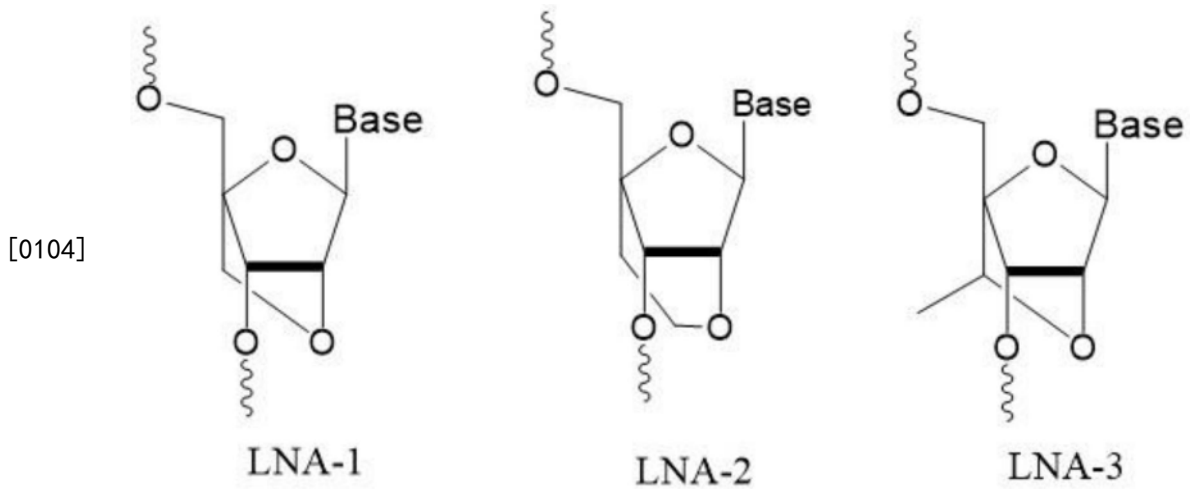
[0099] 通过从式(3)所示的核酸寡聚物将式(1)所示的保护基去保护从而得到下述式(4)所示的核酸寡聚物的反应如下所示。(路线1)。

[0100] [化学式6]



[0102] 式(3)或式(4)中,R表示OQ基、R'表示OQ'基时,核糖的结构如下述式(LNA-1)、(LNA-2)或(LNA-3)所示。

[0103] [化学式7]

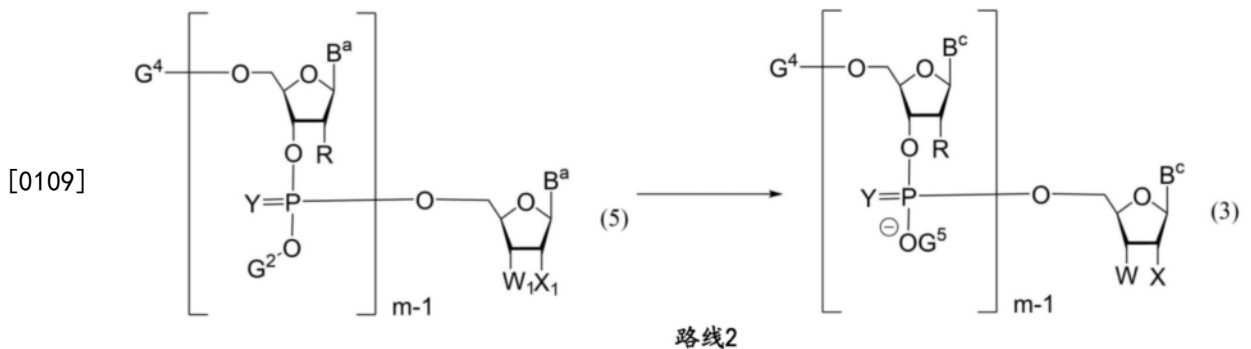


[0105] (式中,Base表示核酸碱基)

[0106] 作为本发明中使用的核酸寡聚物内中所含的核苷(核糖、及脱氧核糖),可例示出DNA、RNA、2'-O-MOE(2'-O-甲氧基乙基)、2'-O-Me、2'-F RNA、及前述的LNA,前述核苷并不限于此。

[0107] 式(3)所表示的核酸寡聚物例如如路线2所示,将式(5)所示的利用固相合成制备的核酸寡聚物从固相载体切出而得到。

[0108] [化学式8]



[0110] 固相载体上合成的式(5)的核酸寡聚物中,

[0111] 式中,

[0112] 取代基Ba各自独立地表示相同或彼此不同的可被保护的核酸碱基,

[0113] G⁴及Y如前述式(3)中所定义的,

[0114] G^2 各自独立地表示相同或彼此不同的磷酸的保护基,

[0115] X_1 表示OZ时, W_1 表示OV基,

[0116] V表示叔丁基二甲基甲硅烷基、或前述式(1)的基团。

[0117] X_1 表示R基时, W_1 表示OZ所表示的基团,

[0118] Z表示固相载体、及将固相载体与核酸寡聚物的3'末端的核糖的2'位或3'位的羟基的氧原子连接的连接部形成的基团。

[0119] 更具体而言,Z表示下述式(6)所示的结构,

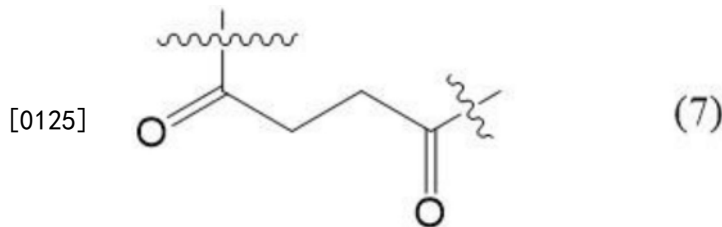
[0120] [化学式9]



[0122] 式(6)中, Sp 表示间隔基。

[0123] 间隔基(Sp)例如可例示出具有下述式(7)中示出的结构式的基团。

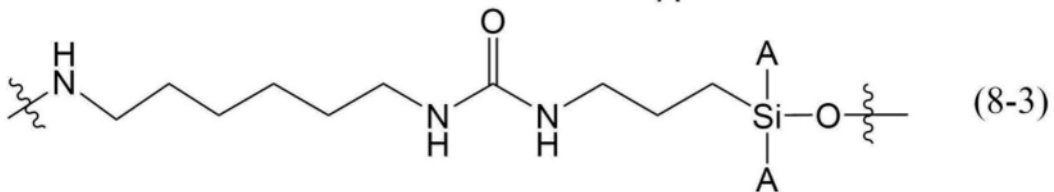
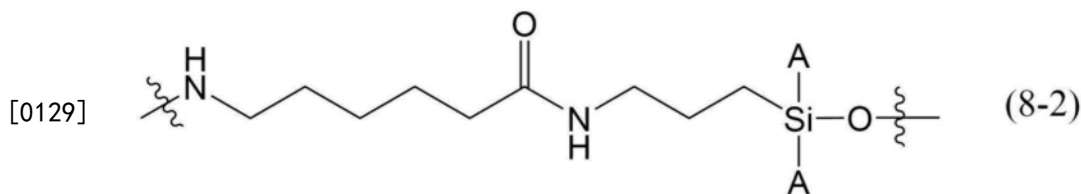
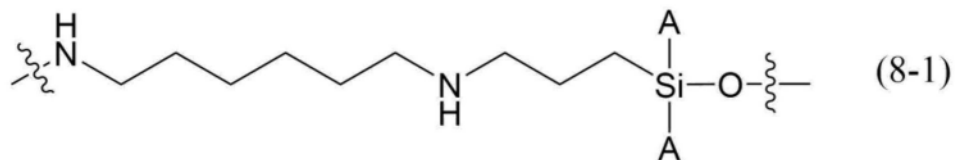
[0124] [化学式10]



[0126] Linker例如可以为下述式(8-1)、(8-2)、(8-3)、(8-4)、(8-5)、(8-6)、(8-7)、(8-8)中示出的结构。

[0127] 作为固相载体(Solid support),可举出无机多孔载体、有机系树脂载体等。对于无机多孔载体,例如可举出可控多孔玻璃(Controlled pore Glass,CPG)及沸石。对于有机系树脂载体,例如可举出由聚苯乙烯形成的载体。

[0128] [化学式11]



[0130] [化学式12]

与4'的碳原子键合的亚乙基、与4'的碳原子键合的乙叉基、或前述式(1)所示的保护基,

[0139] B^a表示可被保护的核酸碱基,

[0140] G¹表示羟基的保护基,

[0141] G²表示磷酸的保护基,

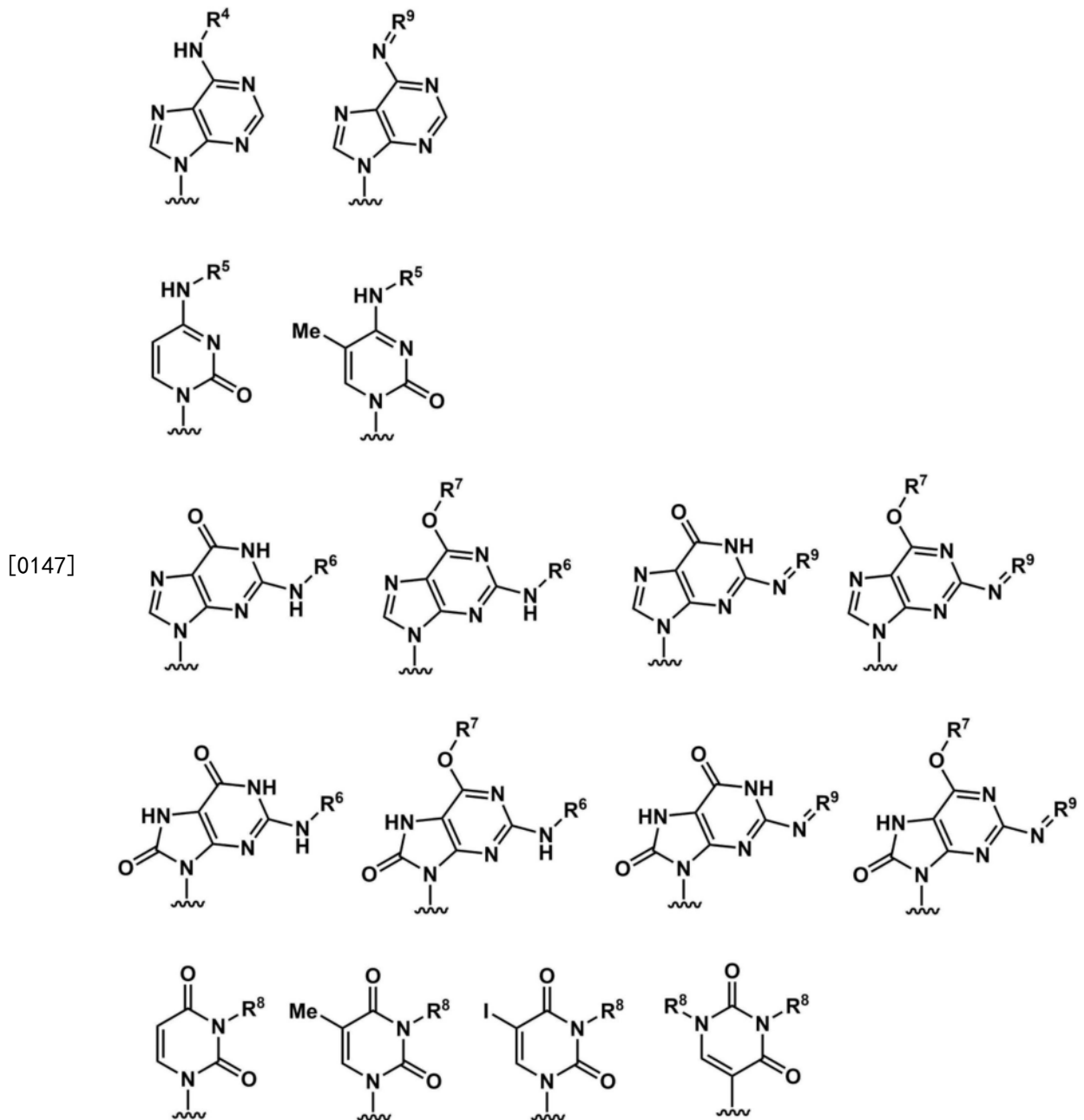
[0142] G³表示烷基、或彼此在其末端键合而成为环状结构)

[0143] B^a中的核酸碱基没有特别限定。作为该核酸碱基,可举出腺嘌呤、胞嘧啶、鸟嘌呤、尿嘧啶、胸腺嘧啶、5-甲基胞嘧啶、假尿嘧啶、1-甲基假尿嘧啶等。另外,核酸碱基也可利用取代基进行取代。作为这样的取代基,例如可举出氟基、氯基、溴基、及碘基等卤原子、乙酰基等酰基、甲基及乙基等烷基、苄基等芳烷基、甲氧基等烷氧基、甲氧基乙基等烷氧基烷基、氰基乙基等氰烷基、羟基、羟烷基、酰氧基甲基、氨基、单烷基氨基、二烷基氨基、羧基、氰基、及硝基等、以及上述中的两种以上的取代基的组合。

[0144] 当核酸碱基在环外具有氨基时,作为该氨基的保护基,没有特别限定,可使用已知的核酸化学中使用的保护基,作为这样的保护基,例如可举出苯甲酰基、4-甲氧基苯甲酰基、乙酰基、丙酰基、丁酰基、异丁酰基、苯乙酰基、苯氧基乙酰基、4-叔丁基苯氧基乙酰基、4-异丙基苯氧基乙酰基、及(二甲基氨基)亚甲基等、以及上述中的两种以上的保护基的组合。

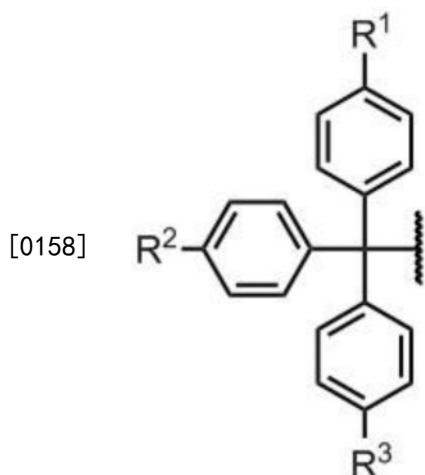
[0145] B^a更具体而言,表示下式中任一者所示的基团,

[0146] [化学式14]



[0156] 作为 G^1 , 优选以下基团。

[0157] [化学式15]



[0159] (式中, R^1 、 R^2 及 R^3 相同或彼此不同,表示氢或烷氧基)

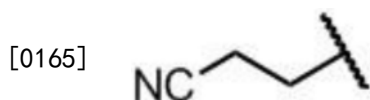
[0160] R^1 、 R^2 及 R^3 优选1个为氢、剩余的2个为相同或彼此不同(优选相同)的烷氧基,作为烷氧基,特别优选甲氧基。

[0161] 作为 G^2 , 只要可作为保护基发挥功能, 则可没有特别限制地使用, 可广泛使用酰胺化合物中使用的已知的保护基。作为 G^2 , 例如可举出烷基、链烯基、炔基、环烷基、卤代烷基、芳基、杂芳基、芳烷基、环烯基、环烷基烷基、环基烷基、羟烷基、氨基烷基、烷氧基烷基、杂环基链烯基、杂环基烷基、杂芳烷基、甲硅烷基、甲硅烷氧基烷基、单烷基甲硅烷基、二烷基甲硅烷基或三烷基甲硅烷基、单烷基甲硅烷氧基烷基、二烷基甲硅烷氧基烷基或三烷基甲硅烷氧基烷基等, 它们可被1个以上的吸电子基团取代。

[0162] G^2 优选为已被吸电子基团取代的烷基。作为该吸电子基团, 例如可举出氰基、硝基、烷基磺酰基、卤原子、芳基磺酰基、三卤代甲基、三烷基氨基等, 优选氰基。

[0163] 作为 G^2 , 特别优选以下基团。

[0164] [化学式16]



[0166] 对于 G^3 而言, 可以2个 G^3 彼此键合而形成环状结构。作为 G^3 , 优选两者为异丙基。

[0167] 前述 R^1 、 R^2 、 R^3 及 G^2 的定义中的烷基可以为直链状或支链状中的任何, 优选为碳原子数为1~12的烷基, 更优选为碳原子数为1~6的烷基。作为具体的烷基的例子, 例如可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基及己基。前述取代基的定义中的构成烷氧基的烷基部分具有与此处的烷基的定义相同的定义。

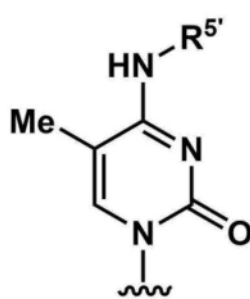
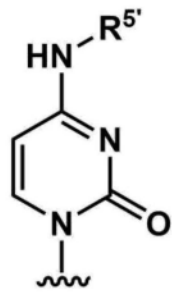
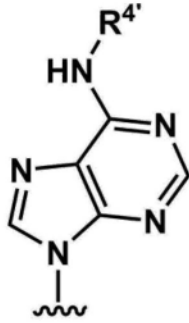
[0168] G^4 表示氢原子或羟基的保护基, 表示保护基时, 表示与 G^1 相同的保护基。 G^4 在去保护时为氢原子, 此时的核苷酸化合物也被供于一系列的核酸延伸反应的工序。

[0169] G^5 表示铵离子、烷基铵离子、碱金属离子、氢离子或羟基烷基铵离子。作为烷基铵离子, 作为具体的烷基的例子, 可举出甲基、乙基、正丙基、异丙基、正丁基、异丁基、叔丁基、正戊基、异戊基及己基, 更具体而言, 例如可举出二乙基铵离子、三乙基铵离子、四丁基铵离子、己基铵离子、及二丁基铵离子等。另外, 作为碱金属离子, 例如可举出钠离子、及锂离子。

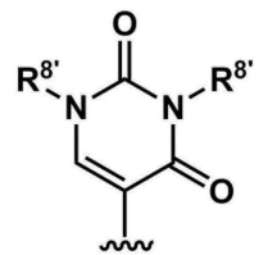
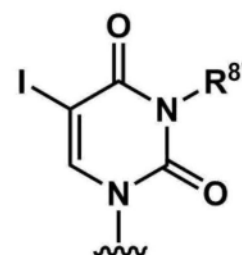
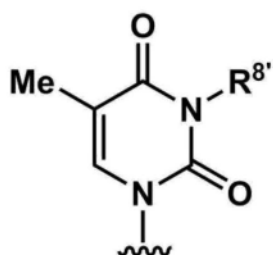
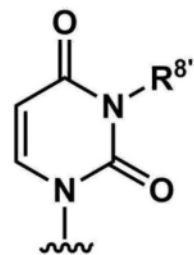
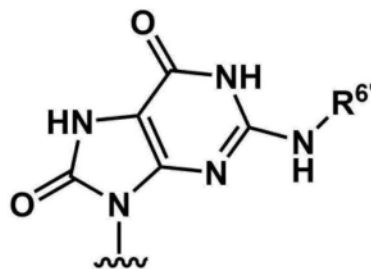
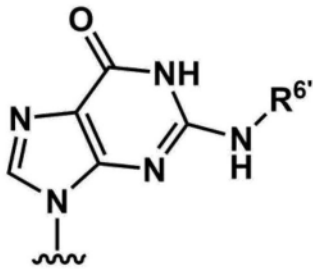
另外,作为羟基烷基铵离子,作为具体的羟基烷基部分的例子,例如可举出羟基甲基、羟基乙基、羟基正丙基、羟基异丙基、羟基正丁基、三羟基甲基,作为更具体的羟基烷基铵离子的例子,可举出三羟基甲基铵离子等。

[0170] 本说明书中,核酸碱基意味着具有天然型或非天然型的核酸碱基骨架的基团。前述核酸碱基也包括天然型或非天然型的核酸碱基骨架经修饰后的修饰体。作为 B^C 所表示的核酸碱基,更具体而言,可例示出以下的结构。

[0171] [化学式17]



[0172]



[0173] (上述式中,

[0174] R^4 表示氢原子、或甲基,

[0175] R^5 表示氢原子、或乙酰基，

[0176] R^6 表示氢原子，

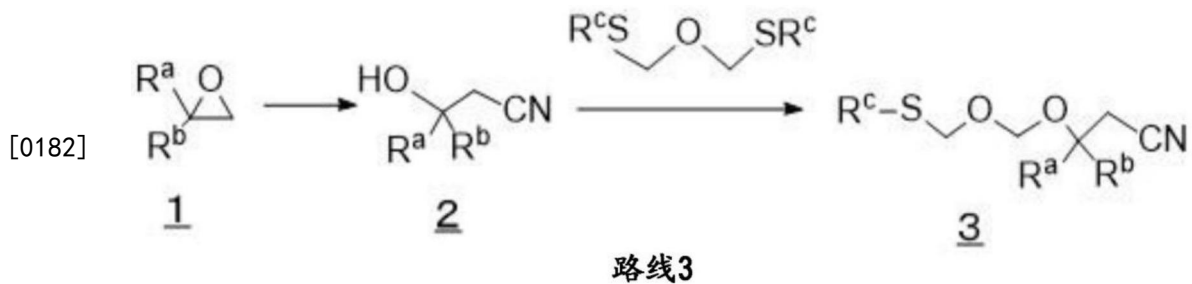
[0177] R^8 表示氢原子、甲基)

[0178] B^a 表示 B^c 所表示的核酸碱基、或该核酸碱基已被保护基保护而得的核酸碱基。

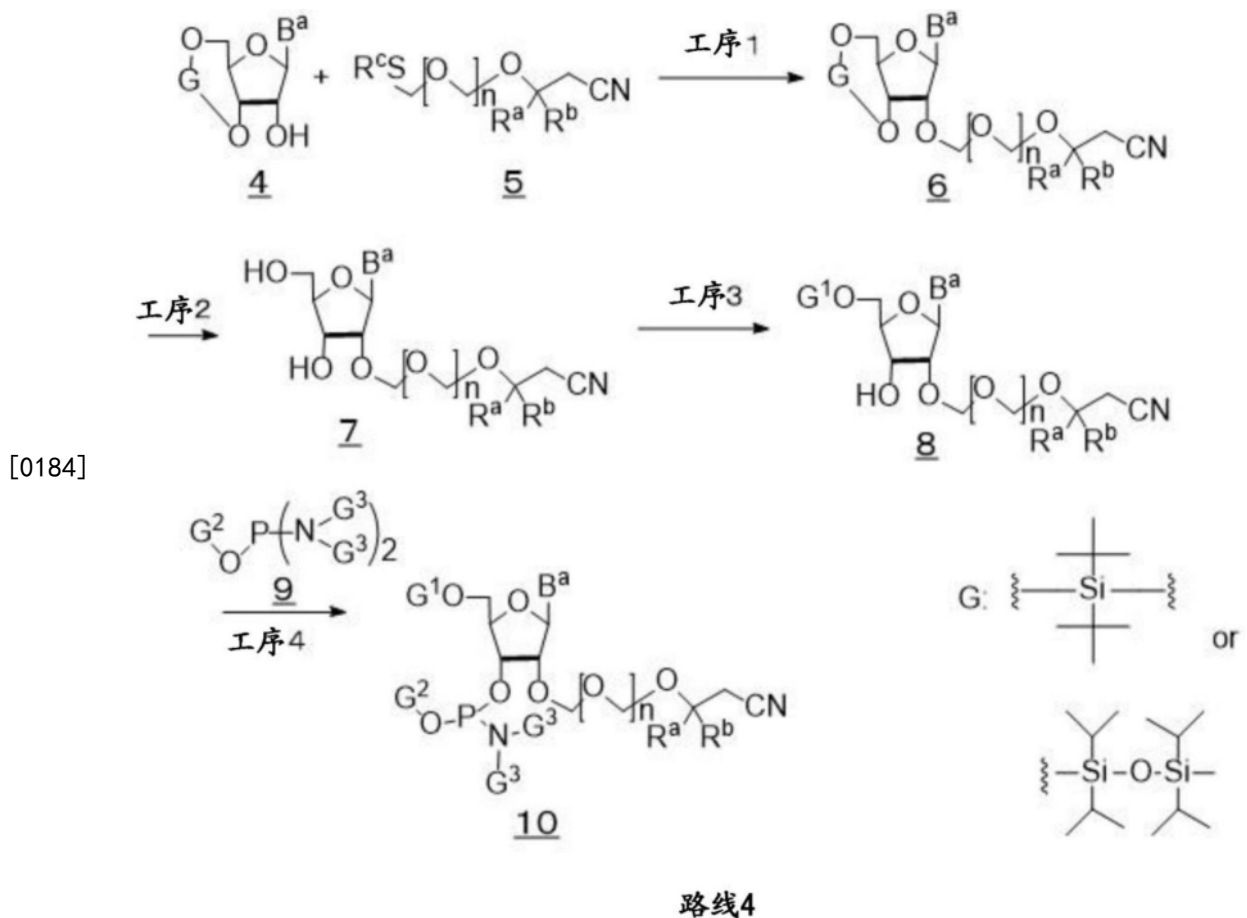
[0179] 以下对包含羟基被式(1)所示的保护基保护的核糖的核苷、其酰胺化合物的制备方法进行说明。

[0180] 核糖的2'位的羟基被式(1)所示的保护基保护的酰胺化合物例如可依照国际公开第2019/208571号公报及日本特愿2018-083148号公报及PCT/JP2019/017249号公报中记载的以下路线3及4而制备。

[0181] [化学式18]



[0183] [化学式19]



[0185] (式中，

[0186] R^a 及 R^b 相同或彼此不同，表示甲基、乙基或氢原子，其中， R^a 及 R^b 不同时表示氢原

子;

[0187] R^c 为甲基或乙基,

[0188] B^a 表示可被保护的核酸碱基,

[0189] n 表示1~5中的任一整数,

[0190] G 表示式中示出的羟基的保护基,

[0191] G^1 及 G^2 相同或彼此不同,各自独立地表示羟基的保护基,并且, G^3 相同或彼此不同,表示烷基。)

[0192] 对前述路线3及路线4进行概述。

[0193] 首先,如路线3所示,使化合物1与氰化物离子反应,得到3-羟基烷基腈化合物2。接着,使该化合物2与双(烷基甲硫基)醚反应,得到醚化合物3。

[0194] 接着,如路线4所示,使化合物4在氧化剂的存在下与化合物5(其以路线3中记载的方法为基准而制备)反应,得到化合物6(核糖的2'位的羟基被式(1)所示的保护基保护)。接着,对该化合物6进行去保护,得到化合物7。选择性地使用保护基 G^1 保护该化合物7的羟基,得到化合物8。另外,使该化合物8与亚磷酰二胺(phosphorodiamidite)化合物9反应,制备所期望的酰胺化合物10。

[0195] 路线3

[0196] 路线3的反应中,

[0197] 作为氰化物离子,例如可使用来源于氰化钠、氰化钾、氰化铜、三甲基氰硅烷等的氰化物离子。

[0198] 使用三甲基氰硅烷的情况下,优选添加碱。

[0199] 作为本反应中的碱,例如可举出碱金属氢氧化物、碱土金属氢氧化物、及氢氧化铵等、以及上述中的两种以上的组合。本发明中,优选使用氢氧化锂及氢氧化锂一水合物。相对于环氧化合物1而言,碱的量通常为0.01~1当量,优选为0.1~0.3当量。

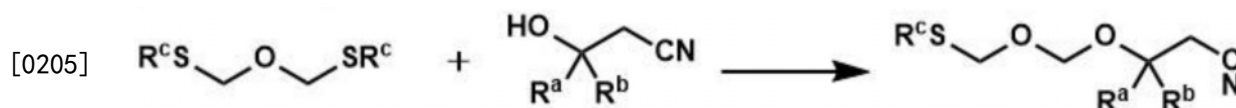
[0200] 相对于化合物1而言,氰化物离子的量通常为0.3~2当量,优选为0.6~0.8当量。

[0201] 本说明书中,除非另有说明,称作“当量”时,意味着“摩尔当量”。

[0202] 本反应的反应温度通常为-20~40℃,优选为0~35℃。本反应的反应时间通常为0.5~24小时,优选通常为1~5小时。

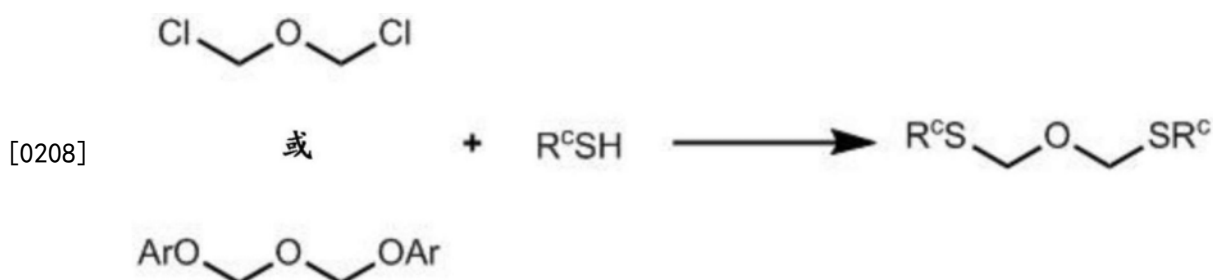
[0203] 醚化合物3例如可通过在氧化剂及酸存在下,使双(烷基甲硫基)醚或双(苯基甲硫基)醚与3-羟基-3-烷基丙腈于溶剂中反应而制备。

[0204] [化学式20]



[0206] 双(烷基甲硫基)醚或双(苯基甲硫基)醚例如可通过如下式所示,通过使双(氯甲基)醚或双(芳基氧基甲基)醚与对应的烷基硫醇或苯基硫醇反应而得到。作为双(芳基氧基甲基)醚,例如可举出双(2,4,6-三氯苯基氧基甲基)醚。

[0207] [化学式21]



[0209] 另外,也可基于后述的实施例中记载的方法或通过根据需要对这些方法加以适当变更的方法而制备。

[0210] 作为氧化剂,例如可举出N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺等N-卤代琥珀酰亚胺、1,3-二碘-5,5-二甲基乙内酰脲等N-卤代乙内酰脲、及氯、溴、碘等卤素等、以及上述中的两种以上的组合。本发明中,优选使用N-卤代琥珀酰亚胺,进一步优选使用N-碘代琥珀酰亚胺。

[0211] 在该反应中,可以除了氧化剂以外也使用酸,酸没有特别限定,例如可举出全氟烷基羧酸及其盐、全氟烷基磺酸及其盐、以及烷基磺酸及其盐、以及上述中的两种以上的组合。作为盐,例如可举出铜盐及银盐。作为酸,具体而言,可举出甲磺酸、对甲苯磺酸、樟脑磺酸、三氟甲磺酸、及三氟甲磺酸银等、以及上述中的两种以上的组合。本发明中,优选使用三氟甲磺酸。

[0212] 作为溶剂,例如可举出四氢呋喃、2-甲基四氢呋喃、环戊基甲醚、二氧杂环己烷、二氯甲烷、及甲苯等、以及上述中的两种以上的组合。本发明中,优选使用四氢呋喃。

[0213] 相对于双(烷基甲硫基)醚或双(苯基甲硫基)醚而言,3-羟基烷基胺的量通常为0.5~2.0当量,优选为0.8~1.5当量。相对于双(烷基甲硫基)醚或双(苯基甲硫基)醚而言,氧化剂的量通常为0.5~2当量,优选为0.7~1.2当量。相对于双(烷基甲硫基)醚或双(苯基甲硫基)醚而言,酸的量通常为0.001~2.0当量,优选为0.01~0.1当量。

[0214] 本反应的反应温度通常为-80℃~0℃,优选为-50℃~-30℃。本反应的反应时间通常为1~24小时,优选为2~6小时。

[0215] 反应的结束例如可通过取样反应物料的一部分,并利用GC、TLC、LC等分析法而进行确认。反应结束后,可向反应物料中加入三乙胺等碱来终止反应。将反应物料加注于水中,供于有机溶剂萃取、洗涤、浓缩等通常的后处理操作,由此可得到包含醚化合物6的残余物。通过将该残余物供于蒸馏、柱层析等纯化操作,可得到高纯度的醚化合物3。

[0216] 路线4

[0217] 路线4的反应中,

[0218] 工序1(醚化工序)

[0219] 制备化合物6的工序可使化合物4与化合物5进行反应而实施。该反应通常添加氧化剂而实施。该工序中使用的氧化剂没有特别限定,优选为选自由N-氯代琥珀酰亚胺、N-溴代琥珀酰亚胺、N-碘代琥珀酰亚胺、碘、1,3-二碘-5,5'-二甲基乙内酰脲、溴及氯组成的组中的至少一种。

[0220] 该工序中,也可添加酸,使用的酸没有特别限定,优选为选自由全氟烷基羧酸、全氟烷基磺酸、烷基磺酸及它们的盐组成的组中的至少一种。

[0221] 该工序中使用的反应溶剂没有特别限定,例如可举出乙醚、THF(四氢呋喃)、2-甲

基四氢呋喃、四氢吡喃、4-甲基四氢吡喃、二甲氧基乙烷、二甘醇二甲醚、环戊基甲醚、二氧杂环己烷等醚、乙腈等腈、甲苯、氯苯、二氯苯等芳香族烃、二氯甲烷等、以及上述溶剂中的两种以上的组合。作为优选的溶剂,可举出乙醚、THF(四氢呋喃)、2-甲基四氢呋喃、四氢吡喃、4-甲基四氢吡喃、二甲氧基乙烷、二甘醇二甲醚、环戊基甲醚、二氧杂环己烷等醚。更优选的溶剂可举出四氢吡喃、4-甲基四氢吡喃。

[0222] 该工序中,反应时间没有特别限定,例如为10分钟~12小时,优选为10分钟~6小时。

[0223] 该工序中,反应温度没有特别限定,例如为-80~30℃,优选为-60~10℃。

[0224] 该工序中,前述醚化合物5的浓度也没有特别限定,可适当设定。

[0225] 该工序中,相对于化合物4的摩尔数而言,醚化合物5的摩尔数例如为0.5~2倍,优选为0.8~1.5倍。

[0226] 该工序中,相对于化合物4的摩尔数而言,前述氧化剂的摩尔数例如为0.5~10倍,优选为0.8~6倍。

[0227] 工序2(去保护工序)

[0228] 前述工序1中得到的化合物6可供于去保护反应而转化成化合物7。去保护工序可通过已知方法而实施,典型地,可在溶剂中使氢氟酸/三乙胺或氢氟酸/吡啶发挥作用以进行去保护。

[0229] 工序3(5'羟基的保护工序)

[0230] 前述工序中得到的化合物7被供于保护工序,保护基的引入可用已知的方法而实施,典型地,可在吡啶中,使4,4'-二甲氧基三苯甲基氯与化合物7反应而引入保护基,制备化合物8。

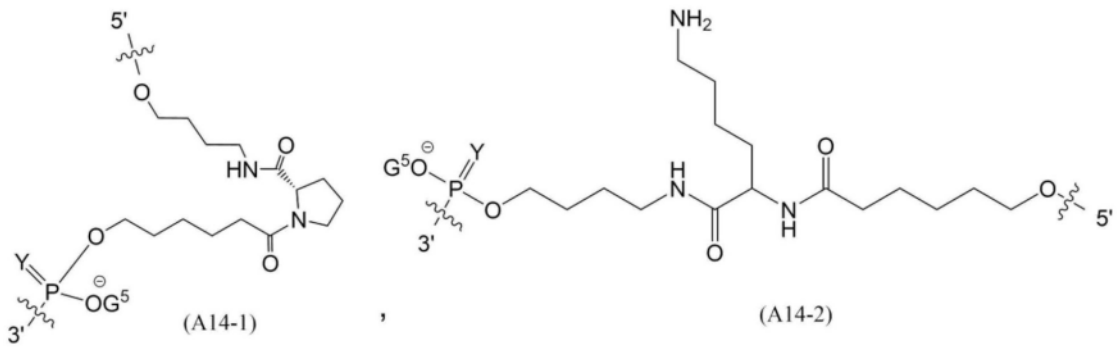
[0231] 工序4(酰胺化工序)

[0232] 该工序可通过使化合物9与前述工序中得到的化合物8反应而实施。典型地,在二异丙基铵盐四氮唑(diisopropyl ammonium tetrazolide)的存在下,使作为化合物9的2-氰基乙基-N,N',N''-四异丙基亚磷酰二胺进行反应而实施,制备酰胺化合物10。酰胺化也可基于日本专利第5554881号公报的实施例2~5中记载的方法而进行。

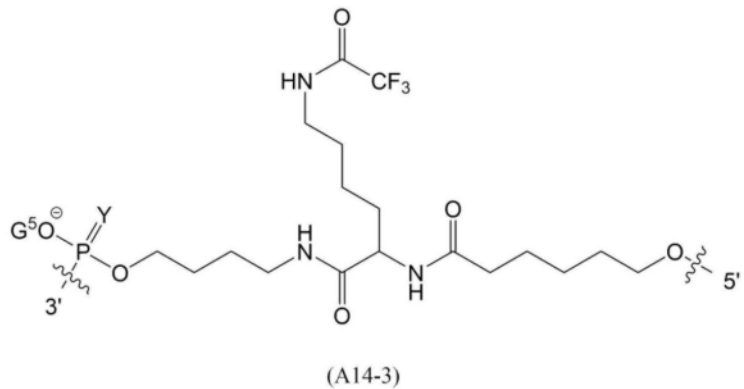
[0233] 对可代替式(3)及式(4)的核酸寡聚物的5'末端和3'末端的核苷酸之间的p个(其中,p为满足式: $m-1 > p$ 的正整数)核苷酸而引入的非核苷酸接头进行说明。

[0234] 作为非核苷酸接头,可例示出包含氨基酸骨架的接头(例如、日本专利第5157168号公报或日本专利第5554881号公报中记载的包含氨基酸骨架的接头)。具体而言,作为非限定的例子,例如可例示出式(A14-1)、(A14-2)或(A14-3)(记载于例如日本专利第5555346号公报或日本专利第5876890号公报)所表示的接头。除上述接头以外,可例示出国际公开第2012/005368号公报、国际公开第2018/182008号公报或国际公开第2019/074110号公报中记载的接头。

[0235] [化学式22]



[0236]



[0237] 式(3)中的R基及式(4)中的R'基为除羟基以外的取代基的核苷酸及酰胺也可从利用日本专利第3745226号公报等中记载的已知的方法、国际公开第2001/053528号公报或日本特开2014-221817号公报及其引用的已知的方法合成的核苷进行制备,此外,可使用可作为市售品而购入的物质,基于后述的实施例中记载的方法或利用对这些方法加以适当变更的方法而制备。

[0238] 从固相载体切出核酸寡聚物(以下也记作寡核苷酸)

[0239] 针对所期望的链长的核酸寡聚物,使用浓氨水作为切出剂,实施切出工序。

[0240] 对于亚磷酰胺法,通常依照已知的方法(例如,前述日本专利第5157168号公报或日本专利第5554881号公报中记载的方法),反复进行去保护工序、缩合工序、及氧化工序中的各工序,从而进行核酸延伸反应。

[0241] (核酸延伸反应)

[0242] 本说明书中,“核酸延伸反应”意味着介由磷酸二酯键使核苷酸依次键合,从而使寡核苷酸延伸的反应。核酸延伸反应可依照通常的亚磷酰胺法的步骤进行。核酸延伸反应也可使用采用亚磷酰胺法的核酸自动合成装置等而进行。

[0243] 核酸寡聚物的链长例如可以为2~200mer、10~150mer、15~110mer。

[0244] 5'去保护工序为对担载于固相载体上的RNA链末端的5'羟基的保护基进行去保护的工序。作为通常的保护基,可使用4,4'-二甲氧基三苯甲基(DMTTr基)、4-单甲氧基三苯甲基、4,4',4''-三甲氧基三苯甲基。去保护可使用酸而进行。作为去保护用的酸,例如可举出三氟乙酸、二氯乙酸、三氟甲磺酸、三氯乙酸、甲磺酸、盐酸、乙酸、对甲苯磺酸等。

[0245] 缩合工序为使式(A13)所示的核苷亚磷酰胺与利用前述去保护工序进行了去保护的寡核苷酸链末端的5'羟基键合的反应。需要说明的是,作为核酸延伸中使用的亚磷酰胺,使用式(A13)或(A12)所示的酰胺化合物。另外,作为其他可使用的亚磷酰胺,可举出2'-OMe、2'-F、2'-O-叔丁基二甲基甲硅烷基,2'-O-甲氧基乙基,2'-H,2'-氟-2'-脱氧-β-D-阿

糖咪喃基等。作为前述核苷亚磷酸酰胺,使用5' 羟基被保护基(例如DMTr基)保护的核苷亚磷酸酰胺。缩合工序可使用激活前述核苷亚磷酸酰胺的激活剂而进行。作为激活剂,例如可举出5-苄硫基-1H-四氮唑(BTT)、1H-四氮唑、4,5-二氰基咪唑(DCI)、5-乙硫基-1H-四氮唑(ETT)、N-甲基苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(N-MeBIT)、苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(BIT)、N-苯基咪唑鎓三氟甲磺酸盐(N-PhIMT)、咪唑鎓三氟甲磺酸盐(IMT)、5-硝基苯并咪唑鎓三氟甲磺酸盐(NBT)、1-羟基苯并三唑(HOBT)或5-(双-3,5-三氟甲基苯基)-1H-四氮唑等。

[0246] 在缩合工序之后,也可适当对未反应的5' 羟基进行加帽(capping)。加帽可使用乙酸酐-四氢咪喃溶液、苯氧乙酸酐/N-甲基咪唑溶液等已知的加帽溶液而进行。

[0247] 氧化工序为将利用前述缩合工序而形成的亚磷酸基转化成磷酸基或硫代磷酸基的工序。本工序为使用氧化剂将三价磷转化成五价磷的反应,可通过使氧化剂作用于担载于固相载体的寡核酸衍生物而实施。

[0248] 将亚磷酸基转化成磷酸基的情况下,作为“氧化剂”,例如可使用碘、或叔丁基过氧化氢、过氧化氢等过氧酸、或10-樟脑磺啞啉(CSO)。该氧化剂可以成为0.005~2M的浓度的方式用适宜的溶剂进行稀释而使用。作为反应中使用的溶剂,只要不阻碍反应即可,没有特别限定,可举出吡啶、THF、水、乙腈、1-甲基咪唑(NMI)或上述中的2种以上任意的混合溶剂。例如可使用碘/水/吡啶/乙腈、或碘/水/吡啶、或碘/水/吡啶/乙腈/NMI、或碘/水/吡啶/THF、或碘/水/吡啶/THF/NMI、或CSO/乙腈、或碘/吡啶-乙酸、过氧酸(叔丁基过氧化氢/二氯甲烷)。

[0249] 将亚磷酸基转化成硫代磷酸基的情况下,作为“氧化剂”,例如可使用硫、3H-1,2-苯并二硫醇-3-酮-1,1-二氧化物(Beaucage试剂)、3-氨基-1,2,4-二噻唑-5-硫酮(ADTT)、5-苯基-3H-1,2,4-二噻唑-3-酮(POS)、[(N,N-二甲基氨基亚甲基)氨基]-3H-1,2,4-二噻唑啉-3-硫酮([(N,N-Dimethylaminomethylidene)amino]-3H-1,2,4-dithiazoline-3-thione)(DDTT)、或苯乙酰二硫化物(PADS)。该氧化剂可以成为0.01~2M的浓度的方式用适宜的溶剂进行稀释而使用。作为反应中使用的溶剂,只要不参与反应,则没有特别限定,例如可举出二氯甲烷、乙腈、吡啶或它们的任意的混合溶剂。氧化工序可以在前述加帽操作之后进行,反之也可以在氧化工序之后进行加帽操作,该顺序没有限定。

[0250] 对磷酸保护基进行去保护的工序为,在具有所期望的序列的核酸的合成完成后,使胺类发挥作用,以对磷酸部分的保护基进行去保护。作为胺类,例如可举出日本专利第4705716号公报中记载的二乙胺等。

[0251] 对于在延伸的最后引入的核苷的5' 羟基的保护基而言,可以在后述从固相载体切出及保护基的去保护之后,出于以5' 保护基为标签的柱纯化的目的而使用,也可以在柱纯化后对5' 羟基的保护基进行去保护。

[0252] 进一步使用氨水或胺类等,例如如前述路线2所示的那样从固相载体切断寡核苷酸链并进行回收。作为胺类,例如可举出甲胺、乙胺、异丙胺、乙二胺、二乙胺等。

[0253] 作为可使用本发明的制备方法制备的核酸寡聚物,可举出核酸寡聚物内中所含的核苷为RNA、DNA、2'-O-MOE、2'-O-Me、2'-F RNA、及LNA的核酸寡聚物,但并不限于此。

[0254] 例如,Xiulong,Shen等著,Nucleic Acids Research,2018,Vol.46,No.46,1584-1600、及Daniel O'Reilly等著,Nucleic Acids Research,2019,Vol.47,No.2,546-558中记载了各种各样的核苷的例子。

脱氧鸟苷。

[0276] 序列(J):5'-AmsGmsUmsCCUCAUCUCCUCAAGCGUUUAAGAGCUAUGCUGGUAACAGCAUAGCAAGUUUAAAUAAGGCUAGUCCGUUAUCAACUUGAAAAAGUGGCACCGAGUCGGUGCUUUUmsUmsUmsU-3' (序列号13)113mer

[0277] 序列(J)中,Um表示2'-0-甲基尿苷,Am表示2'-0-甲基腺苷,Gm表示2'-0-甲基鸟苷,且s表示硫代磷酸修饰。

[0278] 实施例

[0279] 以下,利用实施例更详细地说明本发明,但本发明并不限于此。

[0280] 测定方法

[0281] 在以下的试验中使用的各测定方法如下所示。

[0282] (测定方法1:寡核苷酸的纯度的测定方法)

[0283] 利用HPLC进行固相合成后的寡核苷酸粗产物的纯度的测定。通过HPLC(波长260nm、色谱柱ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18,2.1mm×100mm,1.7μm)将粗产物分离成各成分,根据所得到的色谱图的总面积值中的主产物的面积值计算寡核苷酸的纯度。

[0284] 将HPLC测定条件示于下表1。

[0285] [表1]

色谱柱	ACQUITY UPLC Oligonucleotide BEH C18, 2.1mm×100mm, 1.7 μm
流速	0.2mL/min
检测波长	260nm
流动相A	100mM 乙胺乙酸盐水溶液(pH=7.0)
流动相B	100mM 乙胺乙酸盐水溶液: 乙腈=1:4(v)
[0286] 梯度条件	B conc. 43%(0min)-56%(70min)-90%(70.01min)-90%(75min) -43%(75.01min)-43%(90min)
柱温	80℃

[0287] (测定方法2:寡核苷酸收量的测定)

[0288] 测定前述粗产物的OD₂₆₀。OD₂₆₀表示1mL溶液(pH=7.5)中每10mm光程的UV260nm的吸光度。通常,已知RNA中1OD=40μg,因此基于前述OD₂₆₀的测定值计算收量。进而,计算每单位体积的固相载体的收量。对于实施例1~5及比较例1、2,求出相对于实施例1的收量而言的相对收量。

[0289] (测定方法3:氧浓度的测定)

[0290] 反应体系的气氛(气相)的氧浓度使用IIJIMA ELECTRONICS CORP.制的PACK KEEPER(Residual Oxygen Meter)进行测定。氧浓度测定前,利用测定空气中及纯氮气中的氧浓度来校准装置,然后将装置附带的针刺入用隔膜等盖上的烧瓶等容器中,测定体系中气相部分的氧浓度。实时显示氧浓度的测定值,将测定值稳定时的值作为该气氛的氧浓度。

[0291] 寡核苷酸的固相合成

[0292] 序列(I):5'-AGCAGAGUACACACAGCAUAUACC-P-GGUAUAUGCUGUGUGUACUCUGCUUC-P-G-3' (序列号1、2)53mer

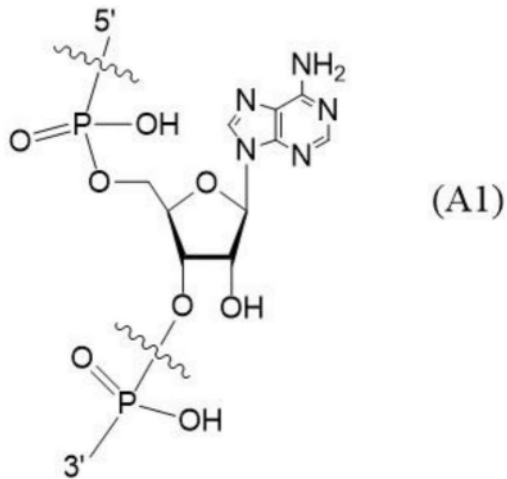
[0293] 前述序列(I)中,“A”由在以下式(A1)中用波浪线划分的局部结构表示。“C”由在以

下式 (A2) 中用波浪线划分的局部结构表示。“G”由在以下式 (A3) 中用波浪线划分的局部结构表示。U由在以下式 (A4) 中用波浪线划分的局部结构表示。“P”由在以下式 (A5) 中用波浪线划分的局部结构表示。需要说明的是,5' 末端的“A”由在以下式 (A6) 中用波浪线划分的局部结构表示。另外,3' 末端的“G”由在以下式 (A7) 中用波浪线划分的局部结构表示。其中,结构式中的磷酸基也可以为盐。

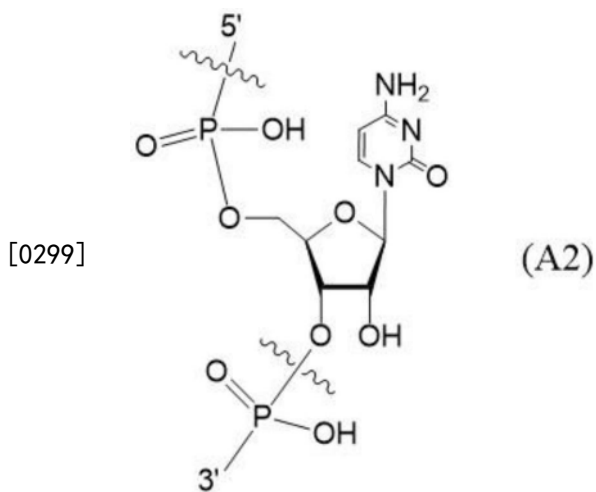
[0294] AGCAGAGUAC ACACAGCAUA UACC (序列号1)

[0295] GGUAUAUGCU GUGUGUACUC UGCUUC (序列号2)

[0296] [化学式23]

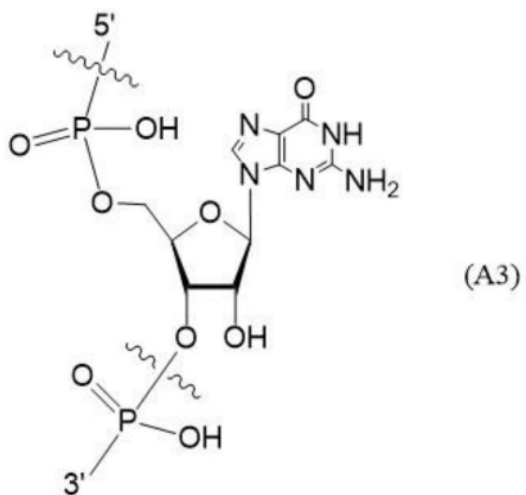


[0298] [化学式24]



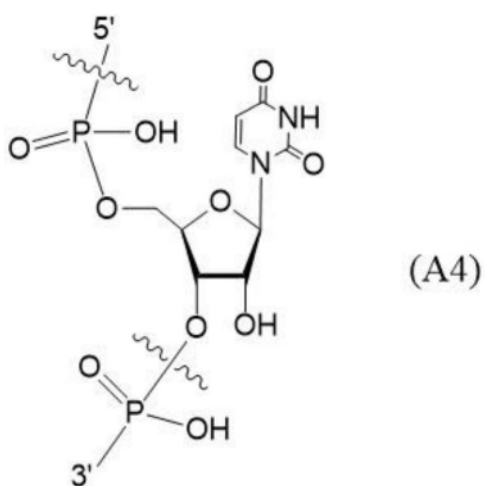
[0300] [化学式25]

[0301]



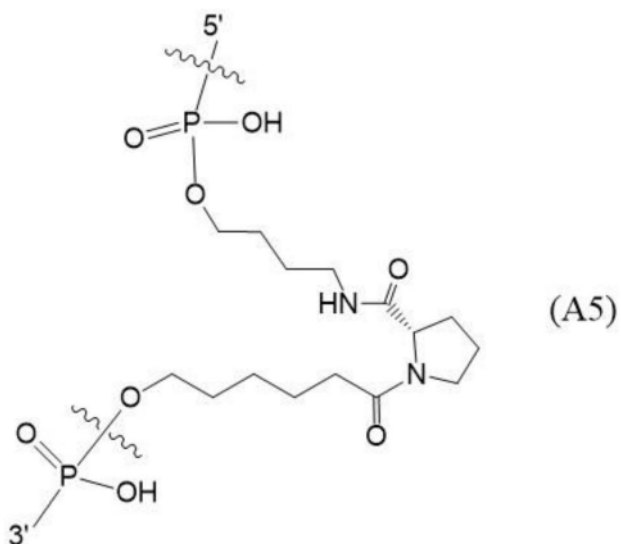
[0302] [化学式26]

[0303]

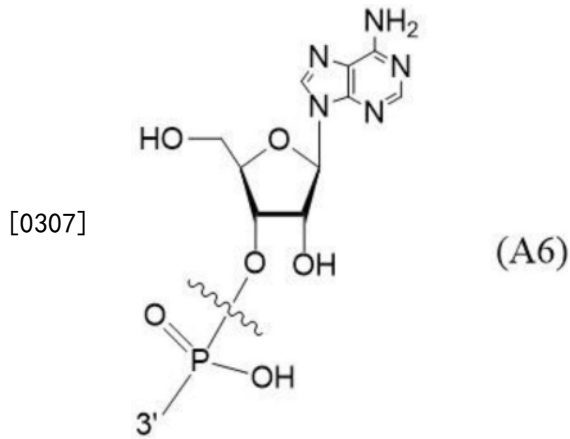


[0304] [化学式27]

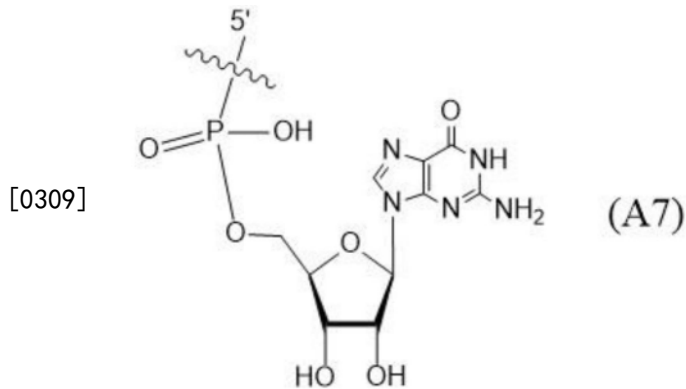
[0305]



[0306] [化学式28]

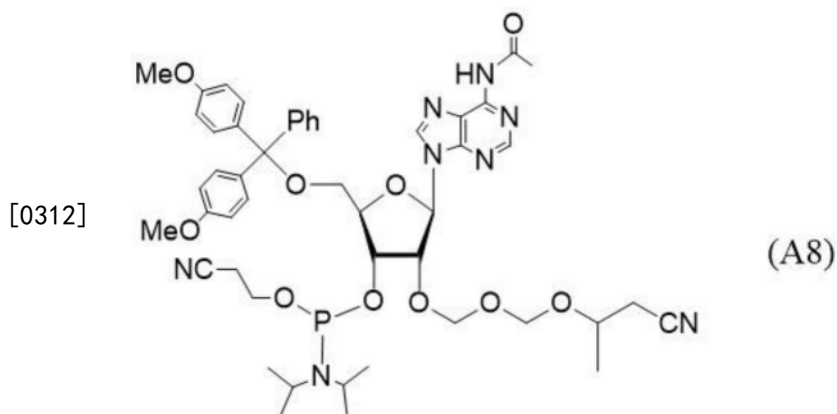


[0308] [化学式29]

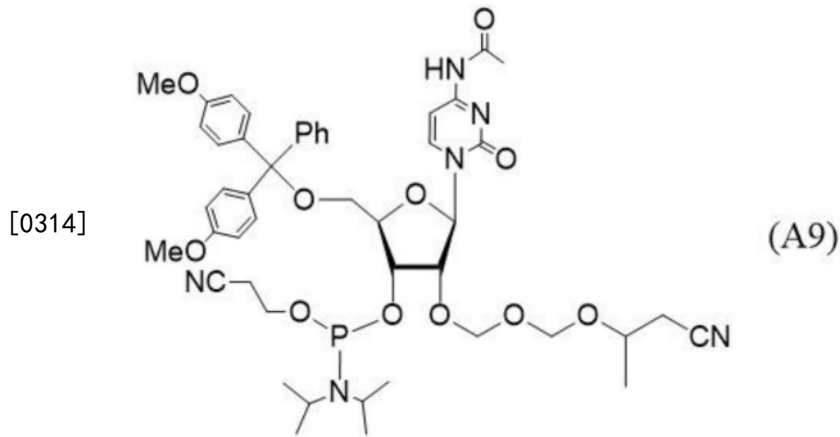


[0310] 使用可控多孔玻璃(Controlled Pore Glass (CPG))作为固相载体,使用AKTA oligopilot plus100(GE Healthcare公司制)作为核酸合成仪,利用亚磷酰胺固相合成法,由3'端向5'端合成由上述序列(I)组成的寡核苷酸。合成以78.20 μmol 规模实施。另外,合成中使用日本专利申请2018-083148号中记载的腺苷PMM酰胺(化合物(A8))、胞苷PMM酰胺(化合物(A9))、鸟苷PMM酰胺(化合物(A10))、尿苷PMM酰胺(化合物(A11))及国际公开第2017/188042号公报中记载的化合物(A12),使用高纯度三氯乙酸甲苯溶液作为去保护(deblocking)溶液,使用5-苄巯基-1H-四氮唑作为缩合剂,使用碘溶液作为氧化剂,使用苯氧基乙酸酐溶液和N-甲基咪唑溶液作为加帽溶液。核酸延伸结束后,使二乙胺溶液作用于载体上的核酸,由此选择性地对磷酸部分的氰基乙基保护基进行去保护。此处,PMM为((1-氰基丙烷-2-基)氧基)甲氧基)甲基的缩写。

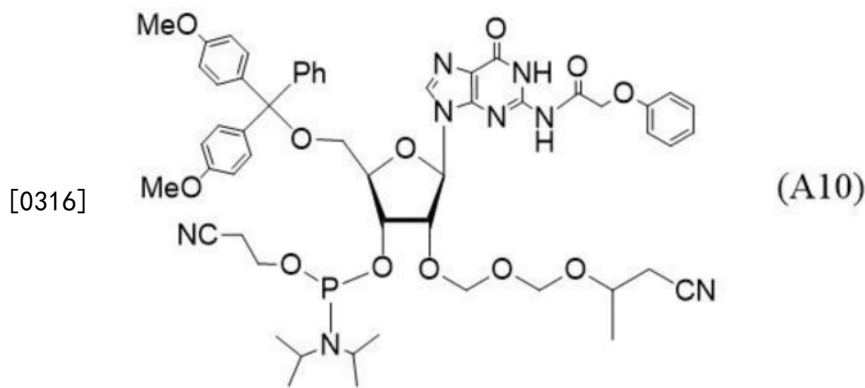
[0311] [化学式30]



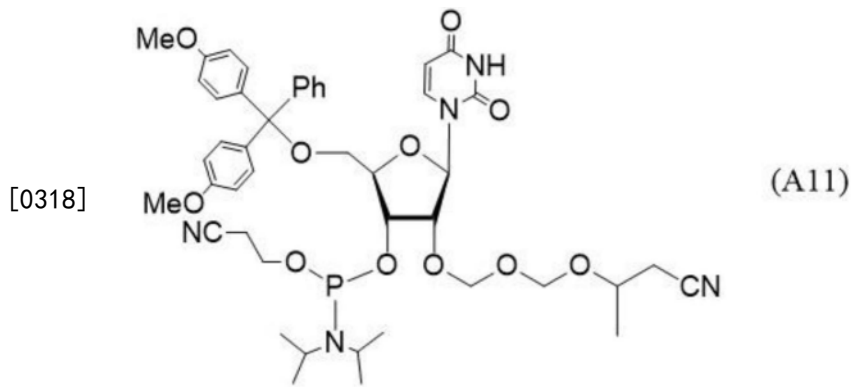
[0313] [化学式31]



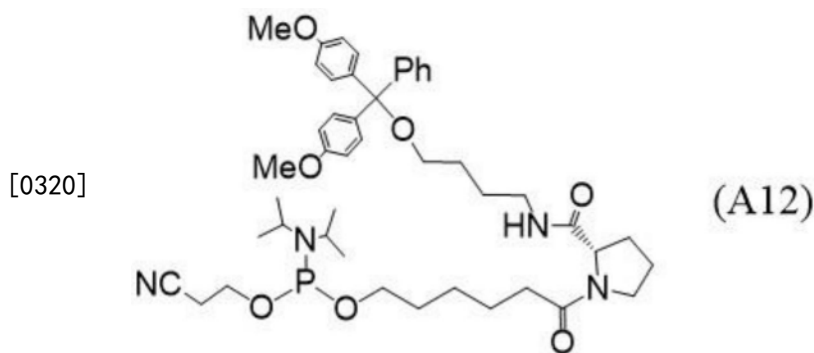
[0315] [化学式32]



[0317] [化学式33]



[0319] [化学式34]



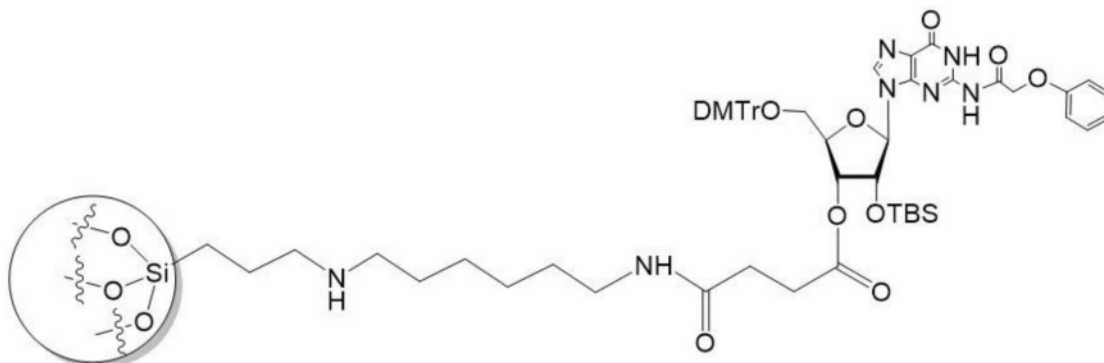
[0321] 接着,示出利用本发明的制法制备的寡核苷酸(核酸寡聚物)的具体的制备例。此

处,下述实施例中利用本发明的制法制备的寡核苷酸为具有前述序列号1及2所示的序列(I)的寡核苷酸。

[0322] 另外,以下实施例及比较例中记载的鸟苷衍生物是指下述的结构式所示的化合物。下述结构式中图示的圆圈示意性地示出了CPG。

[0323] [化学式35]

[0324]



[0325] (实施例1)

[0326] 使用搭载了78.20 μmol 的鸟苷衍生物的CPG、和式(A8)、式(A9)、式(A10)、式(A11)、或式(A12)中示出的酰胺,利用AKTA oligopilot plus100实施序列(I)的固相合成。然后,采集搭载了16.46 μmol 分量的寡核苷酸的CPG载体,使用氨水使寡核苷酸自固相载体游离。接着,将游离寡核苷酸溶解于6.6mL的二甲基亚砜,然后将1.97 μmol 分量的溶液采集至容量100mL、口径29mm茄型烧瓶,进一步向其中加入硝基甲烷10.6 μL 和直径15mm的搅拌子后,用口径29mm的隔膜盖上并密封。进一步将从氮气瓶向体系内喷氮气的针、用于去除喷入的氮气的针、以及Oxygen Meter的测定用针刺入隔膜,使氮气流通,由此将体系内置换成氮气,将气相中的氧浓度设为0%。此处,使用前述测定方法3中记载的方法测定气相中的氧浓度。进一步,使用KDSscientific公司的注射泵,在基于搅拌器的搅拌下于33 $^{\circ}\text{C}$ 向寡核苷酸溶液表面经1小时滴加使用分子筛4A实施了脱水处理的1M的四正丁基氟化铵(TBAF)的二甲基亚砜溶液1.10mL(相对于每1摩尔保护基而言,TBAF的量为10.2摩尔),将混合物进行4小时保温,由此进行2'-PMM保护基的去保护。利用沉淀操作得到粗产物。收量为14.1mg,纯度为62%。对于所得到的粗产物,使用前述测定方法1中记载的方法,测定寡核苷酸的纯度,另外,使用前述测定方法2中记载的方法,测定寡核苷酸的收量。

[0327] (实施例2)

[0328] 使用搭载了78.20 μmol 的鸟苷衍生物的CPG、和式(A8)、式(A9)、式(A10)、式(A11)、或式(A12)中示出的酰胺,利用AKTA oligopilot plus100实施序列(I)的固相合成。然后,采集搭载了19.91 μmol 分量的寡核苷酸的CPG载体,使用氨水使寡核苷酸自固相载体游离。接着,将游离寡核苷酸溶解于8.0mL的二甲基亚砜,然后将3.03 μmol 分量的溶液采集至容量100mL、口径29mm茄型烧瓶中,进一步向其中加入硝基甲烷15.9 μL 和直径15mm的搅拌子后,用口径29mm的隔膜盖上并密封。进一步将从氮气瓶向体系内喷氮气的针、用于去除喷入的氮气的针、以及Oxygen Meter的测定用针刺入隔膜,使氮气流通,由此将体系内置换成氮气,将气相中的氧浓度设为0%。通过与实施例1同样地进行测定来确认气相中的氧浓度。进一步使用注射器,在基于搅拌器的搅拌下于33 $^{\circ}\text{C}$ 向寡核苷酸溶液表面在1分钟以内流入使用分子筛4A实施了脱水处理的1M的四正丁基氟化铵(TBAF)的二甲基亚砜溶液1.66mL(相对

于每1摩尔保护基而言, TBAF的量为10.0摩尔), 将混合物进行4小时保温, 由此进行2'-PMM保护基的去保护。利用沉淀操作得到粗产物。收量为21.7mg, 纯度为60%。对于所得到的粗产物, 与实施例1同样地测定寡核苷酸的纯度及收量。

[0329] (实施例3)

[0330] 使用搭载了78.20 μmol 的鸟苷衍生物的CPG、和式(A8)、式(A9)、式(A10)、式(A11)、或式(A12)中示出的酰胺, 利用AKTA oligopilot plus100实施序列(I)的固相合成。然后, 采集搭载了16.46 μmol 分量的寡核苷酸的CPG载体, 使用氨水使寡核苷酸自固相载体游离。接着, 将游离寡核苷酸溶解于6.6mL的二甲基亚砜, 然后将1.00 μmol 分量的溶液采集至容量100mL口径29mm茄型烧瓶中, 进一步向其中加入硝基甲烷5.3 μL 和直径15mm的搅拌子后, 用口径29mm的隔膜盖上并密封。进一步将从氮气瓶向体系内喷氮气的针、用于去除喷入的氮气的针、以及Oxygen Meter的测定用针刺入隔膜, 使氮气流通, 由此将体系内置换成氮气, 将气相中的氧浓度设为5%。通过与实施例1同样地进行测定来确认气相中的氧浓度。进一步使用注射器, 在基于搅拌器的搅拌下于33 $^{\circ}\text{C}$ 向寡核苷酸溶液表面在1分钟以内流入使用分子筛4A实施了脱水处理的1M的四正丁基氟化铵(TBAF)的二甲基亚砜溶液0.56mL(相对于每1摩尔保护基而言, TBAF的量为10.2摩尔), 将混合物进行4小时保温, 由此进行2'-PMM保护基的去保护。利用沉淀操作得到粗产物。收量为7.1mg, 纯度为60%。对于所得到的粗产物, 与实施例1同样地测定寡核苷酸的纯度及收量。

[0331] (实施例4)

[0332] 使用搭载了78.20 μmol 的鸟苷衍生物的CPG、和式(A8)、式(A9)、式(A10)、式(A11)、或式(A12)中示出的酰胺, 利用AKTA oligopilot plus100实施序列(I)的固相合成。然后, 采集搭载了16.46 μmol 分量的寡核苷酸的CPG载体, 使用氨水使寡核苷酸自固相载体游离。接着, 将游离寡核苷酸溶解于6.6mL的二甲基亚砜, 然后将0.98 μmol 分量的溶液采集至容量100mL口径29mm茄型烧瓶中, 进一步向其中加入硝基甲烷5.3 μL 和直径15mm的搅拌子后, 用口径29mm的隔膜盖上并密封。进一步将从氮气瓶向体系内喷氮气的针、用于去除喷入的氮气的针、以及Oxygen Meter的测定用针刺入隔膜, 使氮气流通, 由此将体系内置换成氮气, 将气相中的氧浓度设为10%。通过与实施例1同样地进行测定来确认气相中的氧浓度。进一步使用注射器, 在基于搅拌器的搅拌下于33 $^{\circ}\text{C}$ 向寡核苷酸溶液表面在1分钟以内流入使用分子筛4A实施了脱水处理的1M的四正丁基氟化铵(TBAF)的二甲基亚砜溶液0.56mL(相对于每1摩尔保护基而言, TBAF的量为10.4摩尔), 将混合物进行4小时保温, 由此进行2'-PMM保护基的去保护。利用沉淀操作得到粗产物。收量为6.9mg, 纯度为54%。对于所得到的粗产物, 与实施例1同样地测定寡核苷酸的纯度及收量。

[0333] (实施例5)

[0334] 使用搭载了78.20 μmol 的鸟苷衍生物的CPG、和式(A8)、式(A9)、式(A10)、式(A11)、或式(A12)中示出的酰胺, 利用AKTA oligopilot plus100实施序列(I)的固相合成。然后, 采集搭载了16.46 μmol 分量的寡核苷酸的CPG载体, 使用氨水使寡核苷酸自固相载体游离。接着, 将游离寡核苷酸溶解于6.6mL的二甲基亚砜, 然后将1.00 μmol 分量的溶液采集至容量100mL口径29mm茄型烧瓶中, 进一步向其中加入硝基甲烷5.3 μL 和直径15mm的搅拌子后, 用口径29mm的隔膜盖上并密封。进一步将从氮气瓶向体系内喷氮气的针、用于去除喷入的氮气的针、以及Oxygen Meter的测定用针刺入隔膜, 使氮气流通, 由此将体系内置换成氮气,

将气相中的氧浓度设为15%。通过与实施例1同样地进行测定来确认气相中的氧浓度。进一步使用注射器,在基于搅拌器的搅拌下于33°C向寡核苷酸溶液表面在1分钟以内流入使用分子筛4A实施了脱水处理的1M的四正丁基氟化铵(TBAF)的二甲基亚砷溶液0.56mL(相对于每1摩尔保护基而言,TBAF的量为10.2摩尔),将混合物进行4小时保温,由此进行2'-PMM保护基的去保护。利用沉淀操作得到粗产物。收量为7.1mg,纯度为46%。对于所得到的粗产物,与实施例1同样地测定寡核苷酸的纯度及收量。

[0335] (参考例1)

[0336] 使用搭载了78.20 μ mol的鸟苷衍生物的CPG、和式(A8)、式(A9)、式(A10)、式(A11)、或式(A12)中示出的酰胺,利用AKTA oligopilot plus100实施序列(I)的固相合成。然后,采集19.91 μ mol分量,使用氨水使寡核苷酸自固相载体游离。接着,将游离寡核苷酸溶解于8.0mL的二甲基亚砷,然后将1.01 μ mol分量采集至容量100mL口径29mm茄型烧瓶中,进一步向其中加入硝基甲烷5.3 μ L和直径15mm的搅拌子后,用口径29mm的隔膜盖上并密封。将Oxygen Meter的测定用针刺入隔膜,以与实施例1同样的方式测定体系内气相中的氧浓度,结果氧浓度为21%。进一步,使用注射器,在基于搅拌器的搅拌下于33°C向寡核苷酸溶液表面在1分钟以内流入使用分子筛4A实施了脱水处理的1M的四正丁基氟化铵(TBAF)的二甲基亚砷溶液0.56mL(相对于每1摩尔保护基而言,TBAF的量为10.1摩尔),将混合物进行4小时保温,由此进行2'-PMM保护基的去保护。利用沉淀操作得到粗产物。收量为7.2mg,纯度为41%。对于所得到的粗产物,与实施例1同样地测定寡核苷酸的纯度及收量。

[0337] (参考例2)

[0338] 使用搭载了78.20 μ mol的鸟苷衍生物的CPG、和式(A8)、式(A9)、式(A10)、式(A11)、或式(A12)中示出的酰胺,利用AKTA oligopilot plus100实施序列(I)的固相合成。然后,采集搭载了16.46 μ mol分量的寡核苷酸的CPG载体,使用氨水使寡核苷酸自固相载体游离。接着,将游离寡核苷酸溶解于6.6mL的二甲基亚砷,然后将1.96 μ mol分量的溶液采集至容量100mL口径29mm茄型烧瓶中,进一步向其中加入硝基甲烷10.6 μ L和直径15mm的搅拌子后,用口径29mm的隔膜盖上并密封。将Oxygen Meter的测定用针刺入隔膜,以与实施例1同样的方式测定体系内气相中的氧浓度,结果氧浓度为21%。进一步,使用KDSscientific公司的注射泵,在基于搅拌器的搅拌下于33°C向寡核苷酸溶液表面经1小时滴加使用分子筛4A实施了脱水处理的1M的四正丁基氟化铵(TBAF)的二甲基亚砷溶液1.10mL(相对于每1摩尔保护基而言,TBAF的量为10.2摩尔),将混合物进行4小时保温,由此进行2'-PMM保护基的去保护。利用沉淀操作得到粗产物。收量为14.2mg,纯度为47%。对于所得到的粗产物,与实施例1同样地测定寡核苷酸的纯度及收量。

[0339] 将测定结果示于下述表2。

[0340] [表2]

	氧浓度	添加TBAF所需的时间	TBAF添加结束后的保温时间	反应温度	每单位体积的相对收量	HPLC测定纯度
[0341] 实施例 1	0 %	1 小时	4 小时	3 3 °C	1 . 0 0	6 2 %
实施例 2	0 %	1 分钟以内	4 小时	3 3 °C	1 . 0 1	6 0 %
实施例 3	5 %	1 分钟以内	4 小时	3 3 °C	0 . 9 9	6 0 %
实施例 4	1 0 %	1 分钟以内	4 小时	3 3 °C	0 . 9 9	5 4 %
实施例 5	1 5 %	1 分钟以内	4 小时	3 3 °C	0 . 9 9	4 6 %
参考例 1	2 1 %	1 分钟以内	4 小时	3 3 °C	1 . 0 1	4 1 %
参考例 2	2 1 %	1 小时	4 小时	3 3 °C	1 . 0 2	4 7 %

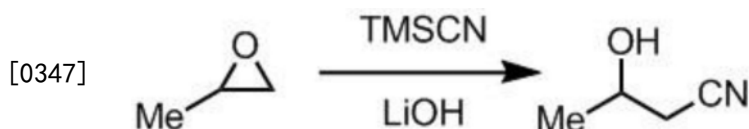
[0342] 如上述表2所示,在氧浓度为15%以下的浓度的非活性气体气氛下进行说明书中记载的寡核苷酸中所含的核糖的羟基的保护基的去保护反应,与在氧浓度高于15%的浓度下进行的情况相比,该去保护反应高效地进行,进一步通过将添加TBAF所需的时间设为30分钟以上,该去保护反应进一步高效地进行,结果可知,生成的经去保护的寡核苷酸的纯度高。

[0343] (参考例)

[0344] PMM酰胺的制备

[0345] 1) 3-羟基丁腈的制备

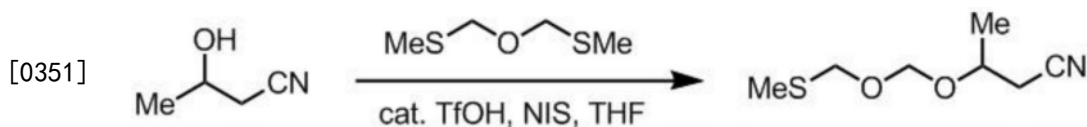
[0346] [化学式36]



[0348] 向氧化丙烯(12.4g、0.21mol)中加入氢氧化锂一水合物(1.8g、42.8mmol),冷却至4°C,缓慢滴加三甲基氰硅烷(15.5g、0.15mol)。滴加结束并经过数十分钟后,内温上升至35°C。直接于冰浴(内温5°C)中搅拌30分钟,于10~15°C搅拌1小时,进一步于室温(25°C)搅拌30分钟。向反应液中加入水(15mL)并于室温搅拌30分钟。然后,进行乙醚(50mL×3回)萃取、饱和食盐水洗涤、无水硫酸钠干燥,蒸馏去除溶剂,结果得到无色透明液状的粗3-羟基丁腈10.6g(收率84%)。

[0349] 2) PMM化剂的制备

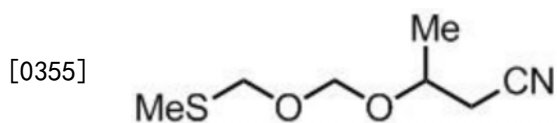
[0350] [化学式37]



[0352] 将双(甲基甲硫基)醚(32.41g、0.234mol、2.0eq.)溶解于无水THF(300mL),加入分子筛4A(32g)搅拌10分钟。将混合物冷却至-50°C,添加三氟甲磺酸(TfOH)(0.88mL、5.85mmol、0.05eq.)和N-碘代琥珀酰亚胺(NIS)(31.5g、0.140mol、1.2eq.),向其中滴加粗3-羟基丁腈(10g、0.117mol),于-50~-45°C左右搅拌2小时。向反应液中加入饱和亚硫酸钠水溶液(150mL)、饱和碳酸氢钠(150mL)及乙酸乙酯(300mL),于0~10°C搅拌10分钟。分液后,用饱和食盐水(150mL)洗涤有机层,用无水硫酸镁干燥后,减压下蒸馏去除溶剂。用硅胶层析对残余物进行纯化(己烷/AcOEt=10/1~5/1、二氧化硅800mL),得到黄色液状物的PMM化剂5.9g(收率28%)。利用GC/FID进行了纯度分析,结果纯度为97.2%。

[0353] PMM化剂

[0354] [化学式38]



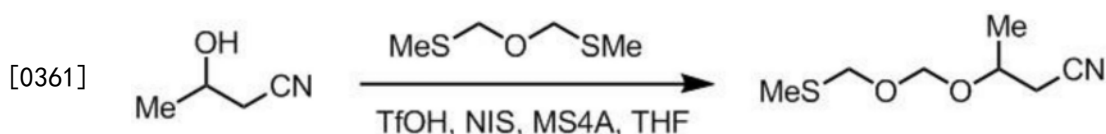
[0356] 淡黄色透明液体

[0357] $^1\text{H-NMR}$ (CDCl_3): δ 4.93-4.84 (m, 2H) 4.75 (s, 2H) 4.06-4.00 (m, 1H) 2.57 (t, 2H), 2.17 (s, 3H) 1.35 (d, 3H)

[0358] 需要说明的是,双(甲硫基甲基)醚的制造方法参见日本特开2016-50203号公报。

[0359] 3) PMM化剂的制备

[0360] [化学式39]

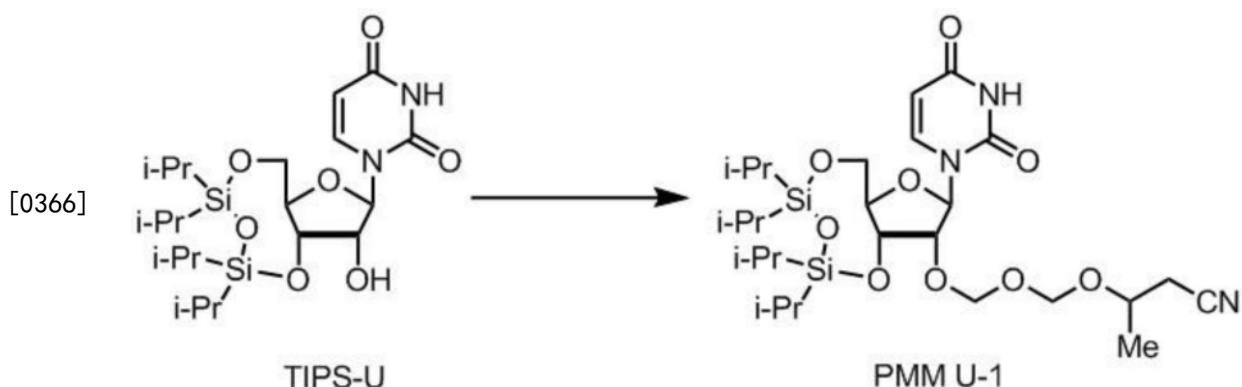


[0362] 将双甲硫基甲基醚 (7.45g、53.9mmol)、分子筛4A (7.5g) 及THF (111mL) 混合,冷却后 (-60 ~ -55 $^{\circ}\text{C}$),添加N-碘代琥珀酰亚胺 (NIS) (14.4g、1.19eq)、三氟甲磺酸 (TfOH) (143 μL 、0.030eq) 及3-羟基丁腈 (5.0g、1.09eq)。于-50 ~ -45 $^{\circ}\text{C}$ 进行4小时搅拌后,滴加三乙胺 (5.1mL)。将反应容器浸在水浴中而使反应液升温至10 $^{\circ}\text{C}$ 左右后,向将预先制备的10 $^{\circ}\text{C}$ 的水溶液 (硫代硫酸钠五水合物21.8g、碳酸氢钠7.7g和水165mL) 中注入反应液。加入乙酸乙酯 (50mL),于10 ~ 15 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌30分钟,用硅藻土 (7.5g) 过滤后进行分液,用饱和食盐水 (30mL) 洗涤有机层,用硫酸镁 (3.8g) 干燥,用旋转式蒸发器浓缩,得到11.5g的粗产物 (11.5g, GC纯度49.8%)。使用硅胶柱 (硅胶300mL、己烷/乙酸乙酯=10/1) 进行纯化,得到3-((甲硫基甲氧基)甲氧基)丁腈 (淡黄色透明液体、5.32g、收率56%、纯度99.5%)。

[0363] 4) 酰胺的制备

[0364] 核酸碱基部分为尿嘧啶的PMM酰胺U的制造例如下所示。具有除尿嘧啶以外的核酸碱基的PMM酰胺也可用同样的方法进行制备。

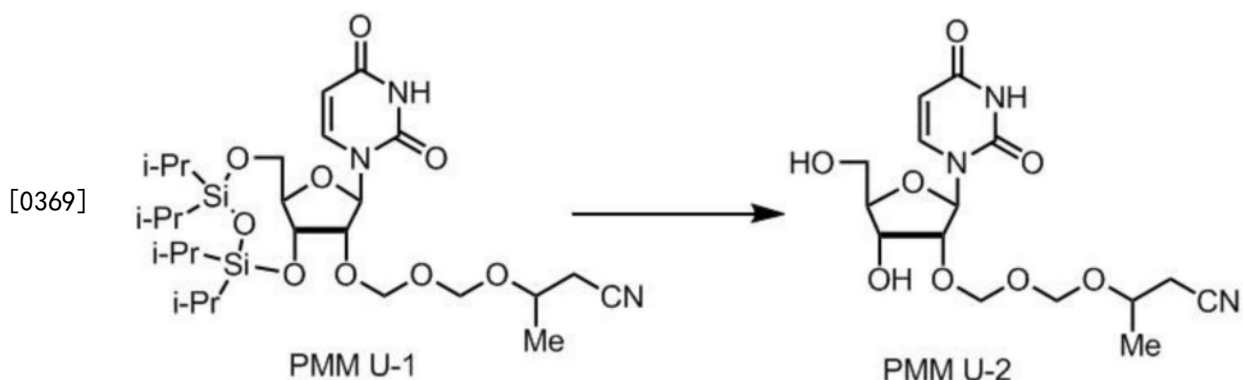
[0365] [化学式40]



[0367] 向容器中投入TIPS-U (20.0g)、THF (40ml) 及甲苯 (60ml),浓缩至74ml进行脱水。将反应液冷却至-50 $^{\circ}\text{C}$,滴加PMM化剂 (10.80g)、TfOH (12.48g)、及NIS (12.4g)/THF (26ml) 溶液。于-50 $^{\circ}\text{C}$ 搅拌2小时后,将反应液加注于经冰冷却的碳酸氢钠 (7.0g) · 硫代硫酸钠

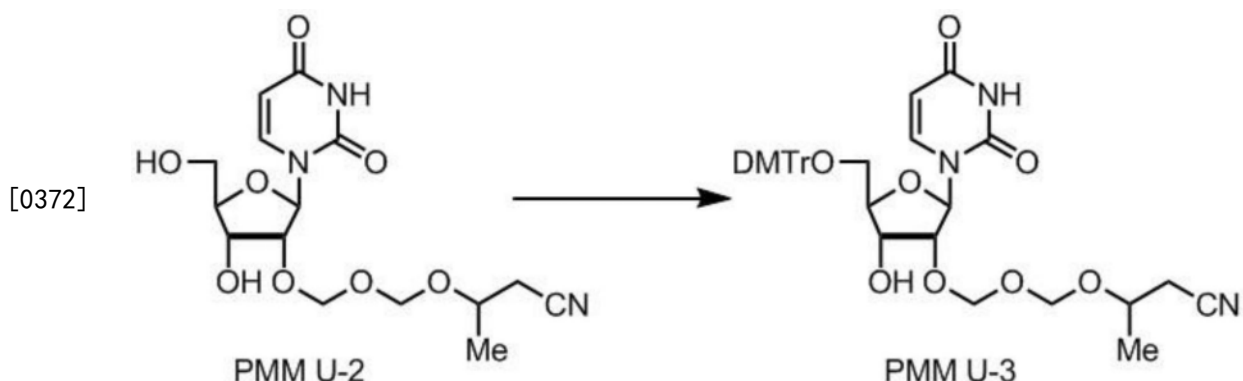
(20.0g)/水(130ml)溶液,于室温进行分液。然后,用碳酸氢钠(3.5g)·硫代硫酸钠(10.0g)/水(65ml)溶液洗涤。浓缩有机层,得到包含目标化合物的粗产物。精确质量(Exact Mass):613.3、实际质量(Actual Mass):612.3(ESI(-))

[0368] [化学式41]



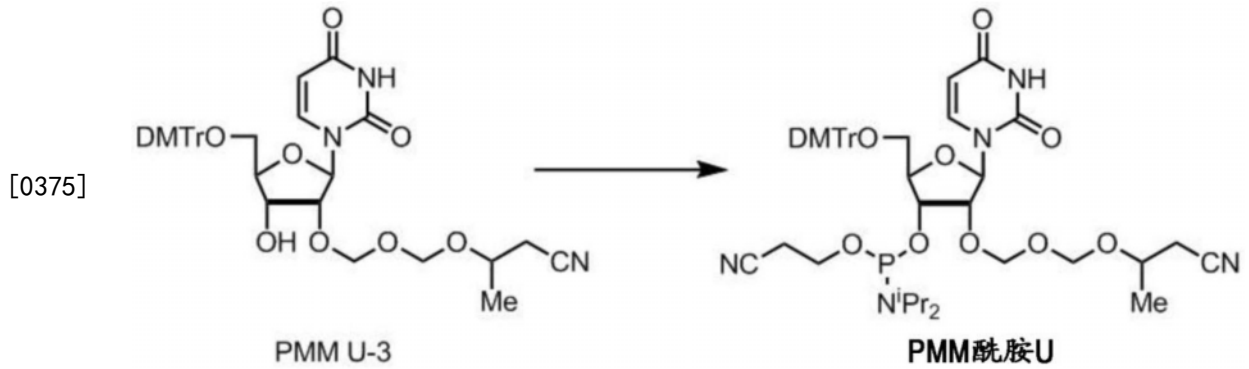
[0370] 使前述粗PMM-U-1溶解于丙酮(40mL),加入三乙胺三氢氟酸盐(7.28g)于20℃搅拌18小时。将反应液加注于叔丁基甲醚(200ml),搅拌30分钟。将反应液过滤,用叔丁基甲醚(40ml)洗涤滤纸上残留的固体,滤取所得到的沉淀物,进行减压干燥,得到包含目标化合物的粗产物(14.56g)。精确质量:371.1、实际质量:370.2(ESI(-))

[0371] [化学式42]



[0373] 投入前述粗PMM-U-2(14.5g)、吡啶(72.5ml)、乙腈(29ml)及甲苯(72.5ml),进行冰冷却。向该混合物中加入4,4'-二甲氧基三苯甲基氯(15.86g),于室温搅拌4小时。然后,加入甲醇(7.2ml)及甲苯(29ml),用5%碳酸氢钠水溶液(43.5ml)洗涤2次,用10%氯化钠水溶液(43.5ml)洗涤1次。然后,浓缩有机层。用硅胶柱层析对浓缩物进行纯化,得到目标物质(21.12g)。精确质量:673.3、实际质量:672.3(ESI(-))

[0374] [化学式43]



[0376] 投入PMM-U-3(20.0g)、乙腈(60ml)、二异丙基铵盐四氮唑(5.88g)、及2-氰基乙基-N,N,N',N'-四异丙基亚磷酰二胺(10.75g),于35℃搅拌4小时。向反应液中加入甲苯(200ml),用5%碳酸氢钠水溶液(100ml)洗涤1次,用50%DMF水溶液(200ml)洗涤5次,用水(100ml)洗涤2次,用10%氯化钠水溶液(100ml)洗涤1次。然后,浓缩有机层,用硅胶柱层析进行纯化,得到目标物质(22.72g)。

[0377] 本发明提供高效的核酸寡聚物的制造方法。可期待按照核酸寡聚物的制造方法制备的核酸寡聚物的纯度得以提高。

[0378] [序列表自由文本]

[0379] 序列表的序列号1~13表示按照本发明的制造方法制备的寡核苷酸的碱基序列。

序列表

	<110> 住友化学株式会社	
	<120> 核酸寡聚物的制造方法	
	<140> PCT/JP2020/032020	
	<141> 2020-08-25	
	<150> JP 2019-187930	
	<151> 2019-10-11	
	<160> 13	
	<170> PatentIn version 3.5	
	<210> 1	
	<211> 24	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 1	
[0001]	agcagaguac acacagcaua uacc	24
	<210> 2	
	<211> 26	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 2	
	gguauaugcu guguguacuc ugcuuc	26
	<210> 3	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (7)..(7), (17)..(17)	

	<223> um	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 胸苷(dT)	
	<400> 3	
	auggaanacu cuuggunacn n	21
	<210> 4	
	<211> 21	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (2)..(2), (12)..(12), (14)..(15), (19)..(19)	
	<223> um	
	<220>	
[0002]	<221> 修饰碱基	
	<222> (5)..(6), (16)..(17)	
	<223> cm	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (20)..(21)	
	<223> 胸苷(dT)	
	<400> 4	
	gnaannaaga gnannnnann n	21
	<210> 5	
	<211> 36	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 5	
	agagccagcc uucuuauugu uuuagagcua ugcugu	36
	<210> 6	
	<211> 23	

	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 6	
	ccaugagaag uaugacaaca gcc	23
	<210> 7	
	<211> 25	
	<212> RNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 7	
	ggcuguuguc auacuucuca ugguu	25
	<210> 8	
	<211> 67	
	<212> DNA	
[0003]	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 8	
	acagcauagc aaguuaaaau aaggcuaguc cguuaucaac uuaaaaagu ggcaccgagu	60
	cggugcu	67
	<210> 9	
	<211> 94	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 9	
	guuuuccuu uucaagaaa ucuccugggc accuaucuuc uuaggugccc ucccuuuuu	60
	aaaccugacc aguuuaccgg cugguuaggu uuuu	94
	<210> 10	
	<211> 100	
	<212> DNA	

	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 10	
	aguccucauc ucccucaagc guuuuagagc uaguauagc aaguuaaaau aaggcuaguc	60
	cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu	100
	<210> 11	
	<211> 113	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<400> 11	
	gcagauguag uguuuccaca guuuuagagc uaucuggaa acagcauagc aaguuaaaau	60
	aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu	113
[0004]	<210> 12	
	<211> 113	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (1)..(1), (8)..(8), (17)..(18)	
	<223> 胸苷(dT)	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (2)..(2), (19)..(19)	
	<223> 2'-脱氧鸟苷	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (3)..(3), (6)..(6), (9)..(9), (11)..(11), (15)..(15)	
	<223> 2'-脱氧胸苷	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (4)..(5), (7)..(7), (10)..(10), (12)..(14), (16)..(16), (20)..(20)	
	<223> 2'-脱氧胞苷	

	<400> 12	
	nnnnnnnnnn nnnnnnnnnn guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu	60
	aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuuu uuu	113
	<210> 13	
	<211> 113	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 合成寡核苷酸	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
[0005]	<222> (1).. (1)	
	<223> 2'-O-甲基腺苷的硫代磷酸酯衍生物	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (2).. (2)	
	<223> 2'-O-甲基鸟苷的硫代磷酸酯衍生物 (gm)	
	<220>	
	<221> 修饰碱基	
	<222> (3).. (3), (110).. (112)	
	<223> 2'-O-甲基尿苷的硫代磷酸酯衍生物 (um)	
	<400> 13	
	nnnccuaucauc ucccucaagc guuuuagagc uaugcuggua acagcauagc aaguuuuuuu	60
	aaggcuaguc cguuaucaac uugaaaaagu ggcaccgagu cggugcuuun nnu	113